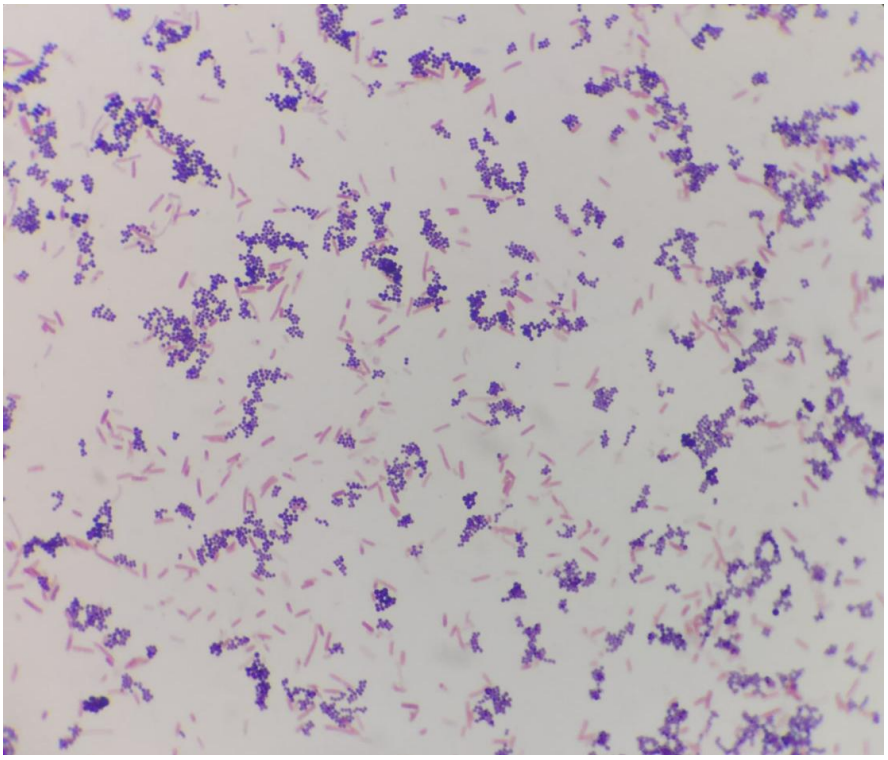


FOLLETO DEL CURSO DE LABORATORIO MICROBIOLOGÍA APLICADA

Elaborado por:
Profesores, Escuela de Biología.

Revisado y actualizado por
Olga Rivas Solano, PhD.
Miguel Rojas Chaves, PhD.
Virginia Montero Campos, PhD.

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA
ESCUELA DE BIOLOGÍA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA
I SEMESTRE, 2026

ÍNDICE

Práctica	**Página**
Práctica 1. Introducción al curso de laboratorio de microbiología aplicada.	2
Práctica 2. Preparación de medios de cultivo.	13
Práctica 3. Tinción de Gram.	18
Práctica 4. Métodos para evidenciar la omnipresencia de microorganismos.	26
Práctica 5. Introducción al estudio de los hongos.	31
Práctica 6. Técnicas de identificación bacteriana.	34
Práctica 7. Aislamiento de bacteriófagos.	41
Práctica 8. Aislamiento de microorganismos fijadores de nitrógeno.	47
Práctica 9. Técnicas para el aislamiento y cuantificación de microorganismos en alimentos.	51
Práctica 10. Análisis microbiológico de aguas.	61
Práctica 11. Control del crecimiento microbiano por agentes físicos y químicos.	65
Práctica 12. Pruebas de sensibilidad a agentes antimicrobianos.	70
Práctica 13. Procesos biotecnológicos de interés industrial.	77
Anexo 1. Composición de los medios de cultivo usados en el curso.	81

PRÁCTICA 1. INTRODUCCIÓN AL CURSO DE LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA APLICADA

Introducción

El curso de Laboratorio de Microbiología Aplicada pretende que el estudiante aplique técnicas, instrumentos y procedimientos para la observación, aislamiento, cultivo y clasificación de diferentes tipos de microorganismos de forma segura.

Todos los cultivos y muestras que se utilicen durante el curso deben ser considerados como **potencialmente patógenos**. Por lo tanto, para que su manipulación sea segura, es necesario respetar las indicaciones proporcionadas en este manual y también las que le dé su profesor(a) durante las clases. Estas están orientadas a prevenir la contaminación microbiana de materiales y muestras de interés, así como la entrada al cuerpo humano de microorganismos que nos puedan causar infecciones.

Las principales vías de ingreso de microorganismos al cuerpo humano son las siguientes:

- Vía digestiva (fecal-oral): la ingestión de alimentos o agua contaminados con microorganismos patógenos puede provocar infecciones gastrointestinales. Por lo tanto, no se permite almacenar bebidas ni alimentos en las mesas de trabajo donde se manipulan los microorganismos. Tampoco ingerir bebidas ni alimentos dentro del laboratorio, ni llevarse a la boca objetos o instrumentos que han estado en uso en el laboratorio (ej. marcadores, micropipetas, etc.).
- Vía cutánea: la piel sana constituye una barrera física protectora. Sin embargo, puede ser traspasada a través de cortes, abrasiones, heridas, picaduras de insectos o inyecciones con agujas contaminadas. En el curso, se trabaja con la bacteria *Staphylococcus aureus* que puede causar infecciones de la piel y tejidos blandos, por lo cual se recomienda cubrir apropiadamente cualquier lesión antes de ingresar al laboratorio. Asimismo, durante el semestre, no se aconseja realizar procedimientos que alteren temporalmente la integridad de la piel como piercings o tatuajes.
- Vía conjuntival: la conjuntiva es la membrana mucosa que recubre la parte interna de los párpados y la superficie anterior del globo ocular. Al ser una mucosa expuesta, puede servir como puerta de entrada para diversos patógenos. Como se mencionó, en el curso se trabaja con *S. aureus*. Esta bacteria también puede causar conjuntivitis infecciosa, por lo tanto, se deben proteger los ojos mediante el uso de lentes de seguridad o lentes correctivos.
- Vía genito-urinaria: algunos microorganismos, como la bacteria *Escherichia coli*, con la cual se trabajará en el curso, pueden ingresar por esta vía y causar infecciones urinarias. Otros microorganismos se transmiten de persona a persona por vía sexual (ej. *Neisseria gonorrhoeae*, Virus del Papiloma Humano), causando infecciones del tracto genital. Sin embargo, en el curso no se trabajará con patógenos de transmisión sexual.

- Vía respiratoria: la inhalación de aerosoles o gotas contaminadas permite el ingreso de microorganismos al sistema respiratorio. Enfermedades como el resfriado común, influenza, COVID-19 y tuberculosis, entre otras, se transmiten comúnmente por esta vía. Si bien en este curso no se trabaja con patógenos respiratorios, se aconseja el uso de mascarilla en caso de enfermedad para prevenir contagios, debido a que se trabaja en un espacio cerrado.

1. Instrucciones de trabajo

a. Buenas prácticas de laboratorio

En el curso se deben aplicar las siguientes buenas prácticas de laboratorio que son básicas para **cualquier laboratorio de microbiología dentro y fuera del TEC**, ya que están orientadas a la prevención de riesgos durante la manipulación de microorganismos y de los reactivos químicos necesarios para su observación, cultivo y caracterización:

- Utilizar gabacha de laboratorio de manga larga debidamente abotonada, pantalones largos y zapatos cerrados.

- Mantener el cabello largo recogido y evitar el uso de productos capilares inflamables (ej. fijadores, sueros, etc.), dado que se trabaja cerca de la llama del mechero. En los laboratorios donde se requiere el uso de cofias, se recomienda evitar productos en gel, con el fin de impedir que el cabello quede adherido a estas.

- Utilizar lentes de seguridad (o correctivos en caso necesario).

- No ingerir alimentos ni bebidas, tampoco fumar ni llevarse objetos como lápices, lapiceros, etc. o instrumentos de laboratorio como micropipetas, pinzas, etc. a la boca o a los ojos.

- No tocarse la boca, ojos y/o rostro cuando se tienen guantes de laboratorio puestos en las manos.

- No permitir el ingreso al laboratorio de personas ajenas al curso, ya que el acceso es restringido.

- No sacar cultivos ni reactivos del laboratorio, a menos que su profesor le indique lo contrario (ej. en la práctica de aislamiento de fijadores de nitrógeno, se debe llevar un cultivo microbiano al invernadero de docencia y su profesor(a) le dará las indicaciones respectivas para hacerlo de forma segura).

- Utilizar el teléfono celular bajo su propia responsabilidad y solamente para los siguientes usos:
    - ✓ Realizar pruebas cortas en línea.

- ✓ Contabilizar el tiempo de algún procedimiento que así lo requiera (ej. tinciones).
- ✓ Tomar fotos de los resultados de las prácticas (ej. tinciones y cultivos), para efectos de completar la bitácora o realizar informes. Antes de tomar cualquier fotografía o video del laboratorio y/o las personas que se encuentran en él, debe solicitar permiso a su profesor(a) y explicar el uso que se le dará a la imagen o video.
- ✓ Si necesita contestar una llamada o un mensaje urgente, deberá hacerlo fuera del laboratorio, y después de haber seguido las reglas que se describirán más adelante.
- ✓ Su profesor(a) no se hará responsable por daños que pueda sufrir el dispositivo durante su uso en el laboratorio.

Si tiene alguna duda, consulte con su profesor(a).

b. Técnica aséptica

La base científica o fundamento de la técnica aséptica se remonta al siglo XIX. En esta época, Louis Pasteur descubrió la presencia de microorganismos en el aire y su capacidad de contaminar cultivos estériles. Además, Joseph Lister introdujo la antisepsia para prevenir infecciones durante procedimientos médicos y quirúrgicos. En general, podemos decir que la técnica aséptica se fundamenta en principios de control del crecimiento microbiano mediante métodos físicos (ej. calor) y químicos (ej. desinfectantes).

En cualquier laboratorio de microbiología, el objetivo principal de la técnica aséptica consiste en evitar la contaminación de muestras, medios de cultivo, equipos, ambiente de trabajo y personas. De forma más específica, la técnica aséptica se emplea para los siguientes propósitos:

- Proteger a las personas usuarias del laboratorio, ya que reduce el riesgo de exposición a microorganismos patógenos, minimizando las infecciones accidentales. El contacto con los microorganismos se puede prevenir utilizando barreras protectoras como gabacha, lentes de seguridad, guantes, etc. También es importante evitar la formación de aerosoles.
- Impedir la contaminación de cultivos puros, debido a que no permite que los microorganismos no deseados ingresen a las muestras, garantizando la fiabilidad y reproducibilidad de los resultados. Para ello es necesario eliminar la carga microbiana de todo lo que vaya a estar en contacto con la muestra o microorganismo de interés. A continuación, se describen algunas estrategias para reducir o eliminar la carga microbiana normalmente presente en diferentes partes:
    - Cristalería y medios de cultivo: se puede eliminar aplicando métodos de esterilización (autoclave, filtración, calor seco) antes de su uso.
    - Manos: se puede reducir mediante lavado y desinfección con antisépticos.
    - Superficies de trabajo: se puede reducir mediante desinfección.

    - Asas: las asas son instrumentos metálicos de uso frecuente para cultivar microorganismos. Estas se pueden esterilizar al calor de la llama. Su profesor(a) le explicará el procedimiento respectivo.
    - Aire: las partículas microbianas suspendidas en el aire se pueden reducir o eliminar trabajando cerca de fuentes de calor (ej. mechero), ya que el calor de la llama genera un pequeño campo estéril de aproximadamente 15-20 cm de diámetro. Además, la llama produce corrientes de aire que alejan las partículas en suspensión en el área cercana. También se puede trabajar dentro de una cámara de flujo laminar. Estos equipos filtran el aire y lo recirculan. Otra consideración importante para evitar la contaminación es no tocar la parte interna de las tapas o medios de cultivo; ni utilizar asas, pinzas pipetas serológicas y/o puntas de micropipeta que hayan tocado accidentalmente el exterior del recipiente donde está contenido el medio de cultivo o el microorganismo de interés, ni poner pipetas o asas en la mesa de laboratorio y luego usarlas sin flamear.
- Evitar la contaminación ambiental. Esto se puede lograr al abrir frascos o tubos en ángulo y flamear la boca de estos antes y después de usarlos, para evitar la salida de microorganismos del ambiente. También mediante el descarte adecuado de materiales contaminados que ya no se van a utilizar.

Recapitulando, **en cualquier laboratorio de microbiología**, la técnica aséptica requiere poner en práctica forma rutinaria procedimientos tales como:

- Desinfección de manos.
- Trabajo en cámaras de flujo laminar para minimizar contaminación aérea, o bien cerca de un mechero.
- Flameado de asas e instrumentos metálicos que estarán en contacto con microorganismos.
- Uso de medios de cultivo, cristalería y reactivos estériles.
- Manipulación cuidadosa de placas y tubos para evitar contacto con superficies no estériles.
- Uso de guantes.
- Esterilización y apropiado descarte de materiales contaminados y cultivos que ya no se necesiten.

A continuación, se describen las principales medidas de técnica aséptica **que se implementarán y evaluarán durante el curso**:

- Antes y después de trabajar debe lavarse las manos con agua y jabón, desinfectarlas con alcohol de 70° (no se usa el alcohol de 90° ya que no tiene poder de desinfección) y secarlas con papel toalla o dejarlas secar al aire. No las seque con la gabacha.

- Si por algún motivo debe salir del laboratorio durante la realización de las prácticas, lávese nuevamente las manos con agua y jabón, desinféctelas con alcohol de 70° y quítese la gabacha.

- Desinfecte el área de trabajo con alcohol de 70° antes y después de trabajar. La organización de la superficie de trabajo también es importante. Los materiales contaminados deben ser separados de los materiales limpios y/o estériles de manera que los primeros no contaminen a los segundos y se debe tener en la mesa de trabajo **únicamente** los materiales, cultivos e instrumentos a utilizar. No coloque bultos, bolsos, cartucheras y otras pertenencias sobre la superficie de trabajo. Utilice para ello los casilleros o el área bajo la mesa de trabajo.

- Las asas de inoculación deben esterilizarse por flameado antes y después de cada uso. El flameado debe iniciarse en el extremo distal del alambre (aro o punta que entra en contacto con el cultivo) y progresar hacia el extremo proximal (zona de unión con el mango), manteniendo el alambre en posición vertical dentro de la llama hasta que alcance el enrojecimiento, como se observa en la figura 1, y con cuidado de no quemarse. Este procedimiento reduce la formación de aerosoles por calentamiento brusco y asegura la esterilización adecuada de la zona de contacto.

Figura 1. Esterilización a la llama del asa bacteriológica.

- Cuando destape un tubo de ensayo estéril o cultivado, flamee la boca de este antes y después de utilizarlo. Además, cuando utilice una placa de Petri estéril o cultivada, nunca la destape por completo, ábrala solo parcialmente y siempre cerca de la llama del mechero.

- Es importante que cada estudiante trabaje cerca de su propio mechero. No se permite que dos o más personas compartan un mismo mechero, ya que esto disminuye la asepsia y aumenta los riesgos de quemaduras.

- Si bien, la mayoría de las prácticas del curso se realizan de forma grupal, **es fundamental, tanto para la asepsia como para la adquisición de destrezas**

individuales, que cada estudiante realice procesos completos por sí mismo y sin intervención ni ayuda de terceros. Seguidamente, a modo de ejemplo, se desglosa la secuencia completa de maniobras a ejecutar para un rayado en placa que es una de las destrezas que se evaluará de forma individual al final del curso: 1-flamear el asa sujetándola con la mano dominante, 2-esperar a que enfríe, 3-abrir parcialmente una placa Petri con la otra mano, 3-tomar una muestra del cultivo microbiano utilizando el asa previamente flameada y fría, 4-cerrar la primera placa y tomar una nueva, 5-abrirla para realizar el rayado, 6-cerrarla, 7-flamear el asa para descontaminarla.

c. Otras recomendaciones para el trabajo con cultivos

Como se mencionó, el trabajo con cultivos requiere la implementación de técnicas de asepsia que incluyen la utilización de mecheros para flamear asas. Sin embargo, el mechero se debe mantener encendido sólo el tiempo indispensable, para evitar que se recaliente el laboratorio y también para no desperdiciar el gas.

Por otra parte, cada tubo de cultivo y/o placa de Petri inoculada se debe rotular con las iniciales de la persona estudiante o las del grupo de trabajo, el nombre del microorganismo inoculado, el número de práctica o experimento, la fecha y cualquier otro dato pertinente (ej. la dilución correspondiente).

Nunca coloque en la incubadora o en la refrigeradora, materiales o cultivos que no hayan sido debidamente rotulados.

Incube siempre las placas en posición invertida (a menos que se le indique lo contrario) y dentro del espacio de la incubadora designado para su grupo de laboratorio. Su profesor(a) le indicará cuál es ese espacio al inicio del semestre.

Una vez concluida la parte experimental de cada práctica, lave la cristalería que no haya estado en contacto con microorganismos y traslade todos los materiales contaminados al carrito metálico que se encuentra al lado de la autoclave. Su área de trabajo debe quedar limpia y ordenada tal y como la encontró al inicio de la práctica.

En caso de utilizar pipetas serológicas, colóquelas en los recipientes dispuestos para dicho propósito. Asegúrese de no dañarles la punta. Nunca coloque pipetas usadas sobre su mesa de trabajo ni utilice pipetas que han estado en contacto con la superficie de trabajo.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación de los cultivos de cada práctica, revise los resultados dentro de los horarios que le indicará su profesor(a). Descarte, en el carrito de material contaminado, todos los cultivos que ya haya revisado. No almacene cultivos ya revisados en refrigeración ni dentro de la incubadora.

d. Recomendaciones para la realización de tinciones

Al efectuar tinciones en la pila, mantenga el agua corriendo para evitar que se manchen. Regrese los colorantes a su sitio cuando termine de usarlos.

Los cubreobjetos y portaobjetos deben sujetarse por los bordes para evitar que se ensucien con la grasa de los dedos y en el momento de flamear los portaobjetos es recomendable utilizar pinzas para evitar quemaduras.

Los microorganismos desecados o fijados sobre los portaobjetos no necesariamente están muertos, por lo que se deben manipular con cuidado y descartar en recipientes con cloro por al menos 24 horas antes de lavarlos.

e. Disposición de desechos

No llene demasiado los recipientes de descarte de material contaminado. Una vez que ha depositado algún objeto dentro de estos no lo remueva por ningún motivo.

La esterilización de los materiales contaminados mediante el uso de calor húmedo (autoclavado) es el método más comúnmente utilizado en los laboratorios de microbiología. La velocidad de destrucción depende del tipo de estructura a destruir (célula vegetativa o espora), del tiempo, la temperatura y de la presencia de humedad. Las condiciones más recomendadas se obtienen con un tratamiento de los desechos a 121°C (15-18 libras de presión) por un período de 20 a 30 minutos, dependiendo del volumen de los desechos.

f. Medidas de seguridad en caso de accidentes

Si se derrama un cultivo o si se presenta alguna situación potencialmente peligrosa, avise de inmediato a su profesor(a) y desinfecte el área como se le indique.

g. Instrucciones a seguir al finalizar el trabajo de laboratorio

Coloque el banco debajo de la mesa, despeje su campo de trabajo y desinféctelo con toalla humedecida con alcohol de 70°. Asegúrese de haber apagado el mechero y de haber cerrado la llave del gas.

Al finalizar cualquier observación al microscopio con el objetivo de 100X, limpie el aceite del lente de inmersión del microscopio con papel para lentes y deje el microscopio en posición de trabajo (objetivo de bajo poder en la posición de observación, cable desconectado y enrollado alrededor del microscopio, microscopio cubierto con su respectivo protector y guardado en los armarios para tal fin).

ANTES DE SALIR DEL LABORATORIO DEBE QUITARSE LA GABACHA, LAVARSE LAS MANOS CON AGUA Y JABÓN, Y LUEGO DESINFECTARLAS CON ALCOHOL DE 70°. ¡Esto es para evitar que usted se lleve los microorganismos con los que ha trabajado para su casa!

2. Uso del microscopio de luz

a. Identificación de las partes de un microscopio de luz

El microscopio de luz se divide en tres partes con diferente función. Por un lado, presenta un componente mecánico cuya función es de soporte. Las principales partes del soporte son la base, el brazo, la platina y las perillas de ajuste macrométrico y el micrométrico.

Además, posee una parte óptica compuesta por un sistema de lentes que funcionan conjuntamente para producir la imagen. La parte óptica incluye los objetivos usualmente de 4X, 10X, 40X y 100X; los oculares generalmente de 10X, el condensador y el diafragma.

Por último, posee un sistema de iluminación que permite visualizar las estructuras.

Con base en la siguiente figura, observe e identifique las diferentes partes señaladas en el microscopio que se le asigne.

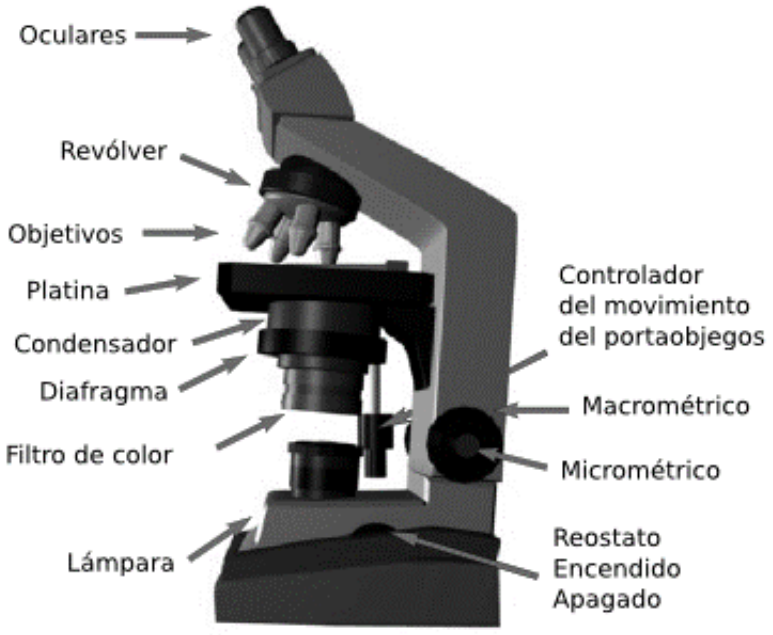


Figura 2. Partes de un microscopio de luz

Objetivos

Aplicar la técnica aséptica en la preparación de un frotis microbiano para su observación al microscopio de luz con el objetivo de inmersión (100X).

Materiales

El estudiante deberá aportar diversos materiales e instrumentos necesarios para el desarrollo de las prácticas, entre ellos:

- Gabacha blanca de manga larga de uso personal.
- Lentes de seguridad o correctivos de uso personal.
- Un juego de asas (bacteriológica, micólogica y de punta) de uso personal.
- Una caja de 50 portaobjetos de 2 ½ x 7 ½ cm (1/2 gruesa) por cada dos personas.
- Una caja de 100 cubreobjetos de 22 x 22 mm por mesa de trabajo (equivale a dos subgrupos de trabajo, aproximadamente entre 4 y 8 personas, según el número de estudiantes de cada grupo).
- Pinzas de punta redonda de uso personal.
- Marcador de tinta permanente de uso personal.
- Caja de fósforos o encendedor de uso personal.
- Una caja de guantes desechables para uso personal (material y talla adecuados) por cada dos personas.
- Un rollo de papel toalla por persona para uso comunal durante las prácticas, estas se le deben entregar a su profesor(a)c.
- Un guante de cocina (aislante de calor) de uso personal para la preparación de medios de cultivo.

Adicionalmente, para esta práctica, se requieren los siguientes materiales suministrados por las personas docentes:

- Cultivos microbianos
- Pinzas, portaobjetos y asa bacteriológica (se proporcionarán únicamente para esta práctica por ser la primera)
- Solución salina estéril (NaCl al 0.85%)
- Cristal violeta
- Microscopio de luz
- Aceite de inmersión
- Papel para limpiar el objetivo de 100 X

Procedimiento

b. Preparación y observación de un frotis mixto

Utilizando pinzas, tome un portaobjetos limpio y exponga durante dos segundos una cara a la llama del mechero para eliminar la grasa que está adherida a la lámina, ya que ésta interfiere con la tinción.

Deje enfriar el portaobjetos con la cara flameada hacia arriba y espere a que enfríe.

Prepare una suspensión mixta con los microorganismos que se le proporcionen.

Para ello, flamee el asa, déjela enfriar y tome de forma aséptica una pequeña porción de uno de los cultivos que se le suministren. Resuspenda la muestra en solución salina estéril. Asegúrese de que quede homogénea y de que se vea turbia. Flamee el asa y déjela enfriar.

Repita el paso anterior completo con los otros microorganismos que se le suministren, de manera que todos queden dentro del mismo tubo (suspensión mixta).

Flamee el asa y déjela enfriar. Tome una alícuota de la suspensión microbiana mixta y deposítela en la superficie desengrasada y fría del portaobjetos. Deje secar y fije a la llama.

NOTA: En el curso, la fijación de los frotis siempre se realizará pasando el portaobjetos por la llama rápidamente tres veces, para que se coagulen las proteínas y la muestra se adhiera a la lámina. También existen otros métodos que se pueden aplicar para fijar la muestra, pero no se utilizarán durante el curso.

Cubra la preparación con el colorante que se le suministre (según la disponibilidad de reactivos, puede ser cristal violeta, safranina o azul de lactofenol) y espere un minuto. Luego lave la lámina con agua del tubo y cuando esté seca, obsérvela al microscopio. Utilice primero los objetivos secos y por último el de inmersión. Tenga cuidado de no ensuciar los objetivos secos con aceite de inmersión. Una vez que termine de utilizar el microscopio debe limpiar el lente de 100 X con el papel para lentes.

Anote sus observaciones en su cuaderno de laboratorio.

Cuestionario

Responda las siguientes preguntas, apoyándose en referencias bibliográficas.

1. Investigue la relevancia médica y/o biotecnológica de los microorganismos con los que se trabajó en esta práctica.

2. Investigue un ejemplo de caso en el que un error en la aplicación de la técnica aséptica tuvo consecuencias negativas, ya sea en biotecnología, en medicina humana, en industria, en agricultura y/o en investigación científica. Analice cuál(es) fue(ron) el(los) error(es) y cómo pudo(pudieron) haberse prevenido.

3. Defina el concepto de poder de resolución e investigue un caso en el que una diferencia en el poder de resolución afectar la observación de un mismo frotis microbiano.

4. Investigue otro método para fijar un frotis microbiano a un portaobjetos y compárelo con el método utilizado en clase, en función de costos, tiempo y peligrosidad.

Referencias

Arias, M.L, Antillón, F., Chaves, C. & Villalobos, L. (2008). *Microbiología de aguas y alimentos. Principios y prácticas de laboratorio*. San José, Editorial Universidad de Costa Rica.

Del Giudice, P. (2020). Skin infections caused by *Staphylococcus aureus*. Acta dermato-venereologica, 100(9). https://doi.org/10.2340/00015555-3466

Espinal, G. (2005). *Manual de prácticas de Microbiología I*. Instituto Tecnológico de Santo Domingo INTEC. Recuperado de http://books.google.com.ec/books?id=q1gALTKvynsC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false

Gamazo, C., López-Goñi, I., Díaz, R. (2005). *Manual práctico de Microbiología*. 3era Edición. España, Editorial Elsevier.

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P.V. & Clark, P.C. (2009). *Brock: Biología de los Microorganismos*. 12 Edición. Madrid, Editorial Prentice Hall.

Montero, V. (2008). *Manual de Prácticas de Laboratorio Microbiología Aplicada*. Instituto Tecnológico de Costa Rica.

O'Callaghan, R. J. (2018). The pathogenesis of *Staphylococcus aureus* eye infections. Pathogens, 7(1), 9. https://doi.org/10.3390/pathogens7010009

Rodríguez, E., Gamboa, M.M., Hernández, F. & García, J.D. (2005). *Bacteriología general: Principios y prácticas de laboratorio*. San José, Editorial Universidad de Costa Rica.

Rojas, N., Chaves, E., García, F. (2006). *Bacteriología Diagnóstica*. Recuperado de http://www.infectologiapediatrica.com/attachments/bacteriologia_diagnostica.pdf

PRÁCTICA 2. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

Introducción

Los microorganismos se pueden clasificar en fotótrofos que son los que emplean la luz como fuente de energía, y en quimiótrofos que son los que requieren sustancias químicas para obtener energía.

Estos últimos a su vez se pueden catalogar como quimiolitótrofos si logran captar energía a partir de compuestos inorgánicos, o como quimiorganótrofos, si utilizan sustancias orgánicas como fuente de energía.

Los microorganismos estudiados en este curso pertenecen a la categoría de quimiorganótrofos de modo que, para su crecimiento *in vitro*, requieren el suministro de una serie de macro y micronutrientes en el medio de cultivo. Los macronutrientes son los que se necesitan en grandes cantidades, como el carbono, el nitrógeno, el fósforo, el azufre, el potasio, el magnesio, el calcio y el sodio. Los micronutrientes por su parte se necesitan solo en pequeñas cantidades y generalmente aparecen como contaminantes de otros compuestos.

Además de estos elementos, es indispensable que el medio de cultivo contenga agua.

También podría ser necesario incorporar factores de crecimiento (vitaminas y aminoácidos) dependiendo de la capacidad biosintética del microorganismo a cultivar.

Por otra parte, si se desea crecer los microorganismos en medio sólido o semisólido, se debe adicionar un agente solidificante. Uno de los más conocidos es el agar, el cual es un polisacárido obtenido de algas marinas de la familia Rhodophyceae. Este compuesto posee características deseables como solubilidad en agua, resistencia a la actividad de la mayoría de los microorganismos, fusión a 98 °C y solidificación a 45 °C. Sin embargo, presenta la desventaja de que su costo es elevado. Usualmente se emplea a una concentración de 1.5 % en medio sólido y aproximadamente 0.4 % en medio semisólido.

En microbiología se usan dos grandes grupos de medios de cultivo, los químicamente definidos y los indefinidos o complejos. Los primeros se preparan con cantidades precisas de compuestos orgánicos o inorgánicos de alta pureza, de modo que se conoce su composición química exacta; mientras que, para los segundos, esta información se desconoce ya que corresponden a extractos de sustancias altamente nutritivas como caseína, carne, soya y levadura, entre otros.

Los medios de cultivo también se pueden catalogar como generales, de enriquecimiento, selectivos o diferenciales. Los medios generales permiten el desarrollo de una gran variedad de microorganismos.

Los medios de enriquecimiento favorecen la proliferación de un determinado tipo de microorganismo sin llegar a inhibir totalmente el crecimiento del resto. Estos medios son útiles para concentrar los microorganismos presentes en una muestra, de modo que posteriormente se puedan aislar con éxito.

Los medios selectivos, como su nombre lo indica, son aquellos que permiten seleccionar el crecimiento de un determinado grupo de microorganismos en particular, debido a que contienen sustancias favorecen el crecimiento de los organismos de interés y sustancias que inhiben el crecimiento de otros microorganismos que no son de interés.

Los medios diferenciales poseen sustancias utilizadas por el microorganismo de interés, así como un indicador que permite, generalmente por un cambio en el color de las colonias, evidenciar si efectivamente el microorganismo está utilizando o no la sustancia incorporada al medio.

Algunos medios de cultivo pueden ser a la vez selectivos y diferenciales como por ejemplo el medio MacConkey suplementado con lactosa, el cual es selectivo para bacterias Gram negativas y diferencial para bacterias fermentadoras de lactosa.

Objetivo

Preparar medios de cultivo para el crecimiento de microorganismos.

Materiales

Botellas con capacidad de 100 mL
Agar de recuento estándar, Bilis Rojo Violeta, Papa Dextrosa y Agar Nutritivo
Erlenmeyer de 200 mL
Balanza granataria
Espátula
Agitador con calor y pastilla magnética
Agua destilada
Papel aluminio

Procedimiento

Pese la cantidad de medio de cultivo que se le indique en un papel para pesar y luego transfiéralo a un Erlenmeyer, debidamente rotulado con el nombre del medio y las iniciales del grupo.

NOTA: Es importante que utilice un Erlenmeyer que tenga la capacidad para contener el doble del volumen de medio que usted va a preparar. Por ejemplo, si va a preparar 250 mL de medio, utilice un Erlenmeyer con capacidad para 500 mL. Esto es para evitar que el medio se derrame al disolverlo con calor. También es necesario que lea cuidadosamente las indicaciones de pesaje y preparación, ya que éstas varían según el medio. Ponga especial atención, si lleva un proceso de autoclavado posterior o no. Asimismo, se debe evitar la inhalación de polvo, ya que puede resultar irritante para las vías respiratorias y los ojos; además, algunos medios de cultivo o sus aditivos pueden ser tóxicos.

Una vez que el medio esté dentro del Erlenmeyer agregue la mitad del volumen de agua destilada. Ejemplo: Si desea preparar 500 mL de medio, agregue 250 mL de agua destilada.

Agite vigorosamente para mezclar. Luego agregue, lentamente, por las paredes del Erlenmeyer, el resto del agua destilada para completar el volumen deseado, tratando de lavar las partículas de medio sin disolver que estén adheridas.

Seguidamente, coloque una pastilla magnética en el fondo del Erlenmeyer, tápelo con papel aluminio, y proceda a calentarlo a temperatura alta en el agitador magnético manteniendo una agitación moderada, hasta que el medio este disuelto.

NOTA: Vigile cuidadosamente el proceso de calentamiento debido a que los medios de cultivo tienden a hervir y derramarse abruptamente, lo cual genera una costra negra en el agitador magnético que es muy difícil de limpiar y que puede dañar el equipo.

Dispense el medio disuelto en botellas para medio de cultivo debidamente rotuladas. Llene hasta un máximo de 2/3 partes de la capacidad de la botella.

Cierre parcialmente las tapas y cúbralas con papel aluminio.

NOTA: Es importante que la tapa quede floja para que se libere el calor y no se genere un vacío que luego dificulte abrir la botella, en especial en los medios que se deben autoclavar, ya que las botellas que están muy cerradas se pueden reventar por la presión que se genera dentro del autoclave.

El personal del laboratorio se encargará de esterilizar los medios que lo requieran, mediante autoclave, utilizando una temperatura de 121 °C y una presión de 15 psi (libras por pulgada cuadrada), durante 15 minutos. Es importante considerar que el tiempo de esterilización debe ajustarse según el volumen del medio y el tamaño del recipiente. Una vez finalizado el proceso, se debe esperar a que los medios se enfríen antes de cerrar correctamente las tapas. Posteriormente, los medios deben almacenarse en refrigeración hasta su uso.

Cuestionario

1. ¿Cuáles son las "propiedades reológicas" del agar?

2. Mencione 5 acciones y/o precauciones que se deben de seguir al preparar un medio de cultivo.

3. Explique ¿qué es una autoclave y como se lleva a cabo el proceso de esterilización?

4. Si un medio de cultivo no puede terminar el proceso de autoclavado porque se fue la luz, explique si se puede o no volver a esterilizar al día siguiente.

5. ¿Cuál es la importancia de utilizar agua destilada en la preparación de medios de cultivo?

Referencias

Gamazo, C., López-Goñi, I., Díaz R. (2005). *Manual práctico de Microbiología*. 3era Edición. España, Editorial Elsevier.

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P.V. & Clark, P.C. (2009). *Brock: Biología de los Microorganismos*. 12 Edición. Madrid, Editorial Prentice Hall.

Mahon C. R., Manuselis G. (2000). *Textbook of Diagnostic Microbiology*. Second Edition. United States of America, W.B. Saunders Company.

Montero, V. (2008). *Manual de Prácticas de Laboratorio Microbiología Aplicada*. Instituto Tecnológico de Costa Rica.

Olivas E., Alarcón L.R. (2004). *Manual de practicas de Microbiología básica y Microbiología de alimentos*. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez.

Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A. (1996). *Microbiology*. Third Edition. United States of America, Wm. C . Brown Publishers.

Rodríguez, E., Gamboa, M.M., Hernández, F. & García, J.D. (2005). *Bacteriología general: Principios y prácticas de laboratorio*. San José, Editorial Universidad de Costa Rica.

PRÁCTICA 3. TINCIÓN DE GRAM

Introducción

Los microorganismos tienen poco contraste cuando se observan sin teñir al microscopio óptico. Para solventar esta situación, es común utilizar colorantes con afinidad por materiales celulares específicos. Algunos como el azul de metileno, el cristal violeta y la safranina, entre otros, se caracterizan por poseer carga positiva, es decir que son catiónicos, de modo que se combinan fuertemente con los constituyentes celulares de carga negativa, como los ácidos nucleicos y los polisacáridos ácidos de la pared celular.

Las tinciones se pueden dividir en simples y diferenciales. Una tinción simple involucra la utilización de un solo colorante para observar la morfología general de una célula de manera rápida. Al emplear un solo colorante todas las células se observan del mismo color. En una tinción diferencial, por el contrario, se emplean dos o más colorantes, de modo que los microorganismos se tiñen en forma diferente según su estructura química o física.

Una de las tinciones diferenciales más utilizadas en microbiología es la tinción de Gram, desarrollada por Christian Gram en 1884. Esta tinción permite agrupar a las bacterias en Gram positivas y Gram negativas según la estructura y grosor de su pared celular.

Las bacterias Gram positivas poseen una capa gruesa de peptidoglicano y carecen de membrana externa. Luego de la tinción aparecen de color púrpura. Las bacterias Gram negativas por su parte, tienen una capa más delgada de peptidoglicano y poseen membrana externa. Luego de la tinción se observan de color rojo.

Estas diferencias estructurales se correlacionan con características biológicas tales como espesor y composición química de la pared celular, producción de toxinas, susceptibilidad a antibióticos y tensión superficial.

Existen algunas variaciones al protocolo original descrito por Gram, sin embargo, en términos generales la tinción involucra los siguientes pasos:

1. Tinción inicial con cristal violeta de modo que todas las células se tiñen de púrpura.

2. Adición de Lugol que actúa como mordente ya que reacciona con el cristal violeta formando un complejo con gran afinidad por el peptidoglicano. En este punto todas las células permanecen de color púrpura.

3. Decoloración con un solvente que disuelve la capa lipídica de la membrana externa de las bacterias Gram negativas y extrae el complejo cristal violeta-Lugol, de modo que éstas quedan incoloras. Como en las Gram positivas, hay un menor contenido

lipídico y un mayor contenido de peptidoglicano asociado al complejo cristal violeta-Lugol, éstas no se decoloran, sino que permanecen de color púrpura.

4. Contra tinción con safranina para teñir de rojo a las bacterias Gram negativas que fueron decoloradas en el paso anterior. Las bacterias Gram positivas no absorben la safranina, por lo que se observan de color púrpura.

Objetivo

Realizar tinciones diferenciales para reconocer la morfología microscópica bacteriana.

Materiales

Portaobjetos de vidrio 2 ½ x 7 ½ cm
Pinzas
Cultivo puro de bacteria Gram negativa
Cultivo puro de bacteria Gram positiva
Cultivo puro de bacteria incógnita
Asas
Tubos de ensayo con 2 mL de solución salina estéril
Goteros
Cristal Violeta
Lugol
Decolorante
Safranina
Papel para lentes
Aceite de inmersión
Microscopios

Procedimiento

1. Preparación de las láminas

Tome dos portaobjetos limpios y exponga durante dos segundos una de las caras de cada portaobjeto a la llama para eliminar la grasa que está adherida a la lámina, ya que ésta interfiere con la tinción.

Deje enfriar los portaobjetos con la cara flameada hacia arriba. Cuando estén fríos rotule con marcador permanente cada portaobjeto, indicando sus iniciales un extremo de la lámina.

NOTA: En ambas láminas se realizarán dos extensiones o frotis. Al lado derecho se ubicará el frotis control que posee bacterias Gram negativas y Gram positivas mezcladas. Al lado izquierdo se colocará, en una de las láminas, el frotis del cultivo puro de una bacteria incógnita.

2. Preparación del frotis correspondiente al control de la tinción

El frotis debe ser delgado, translúcido y homogéneo para que, durante el proceso de tinción, reciba en toda su superficie el mismo tratamiento con cada colorante.

a. Preparación y extensión

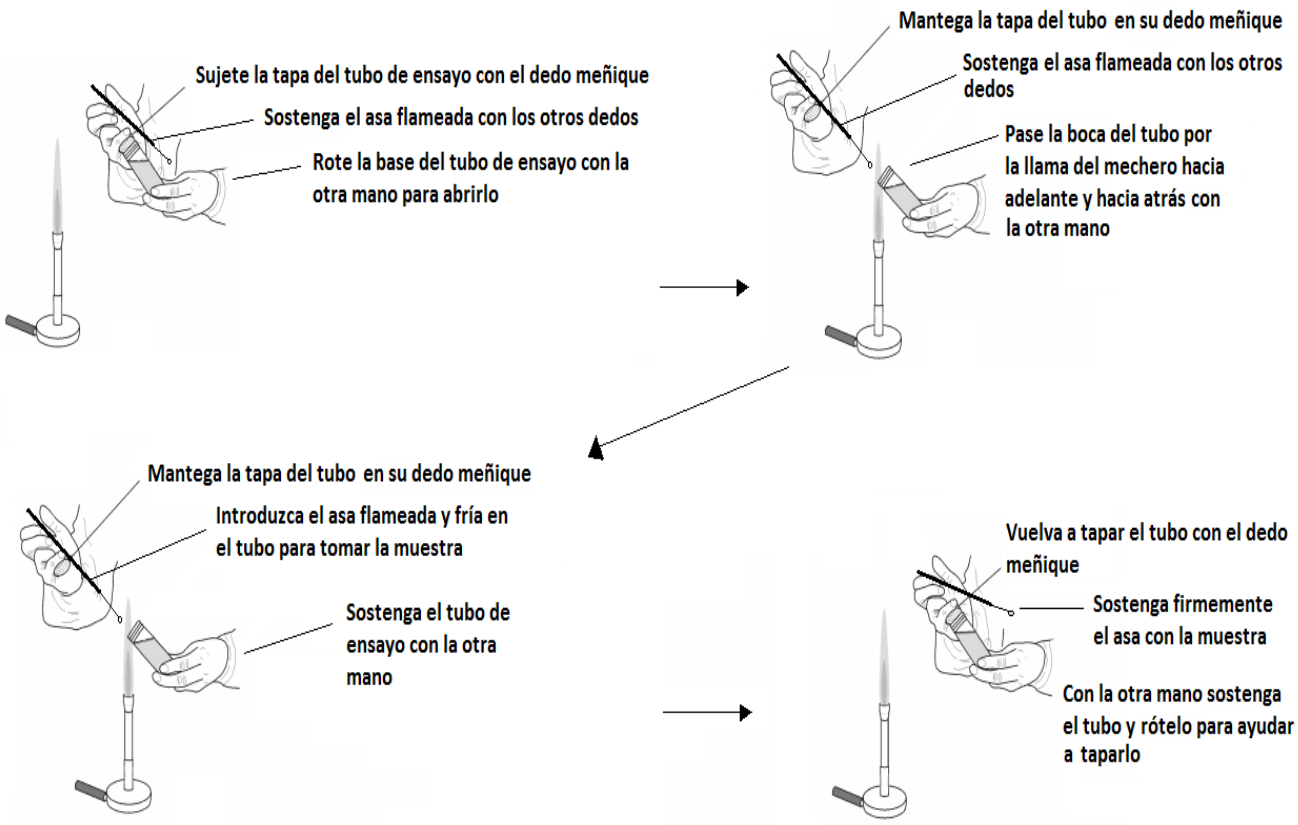
Flamee el asa bacteriológica y déjela enfriar sin que toque ningún objeto.

Con el asa flameada prepare el cultivo mixto. Este es una mezcla de bacterias Gram positivas y Gram negativas que se usará como control de la tinción. Para ello tome una asada alguno de los dos cultivos, ya sea el de la bacteria Gram negativa o el de la Gram positiva. Luego, abra el tubo donde realizará la mezcla, flamee la boca y prepare una suspensión bacteriana, resuspendiendo la asada del cultivo homogéneamente, tratando de no dejar grumos. Seguidamente flamee el asa, tratando de no generar aerosoles, espere a que enfríe, tome una asada del segundo cultivo y proceda a resuspender en el mismo tubo en el que tiene ya resuspendida la primera bacteria. Rotule como “cultivo mixto”.

Con el asa flameada, tome una gota del “cultivo mixto” y extiéndala sobre el lado derecho de cada lámina **por al menos una pulgada de largo y media de ancho, para obtener una buena separación de las células bacterianas** (figura 3). El frotis debe quedar como una capa fina apenas perceptible.

NOTA: Asegúrese que quede espacio suficiente del lado izquierdo de cada lámina ya que en esta parte se realizará la extensión de un cultivo puro de una bacteria incógnita.

A.



B.

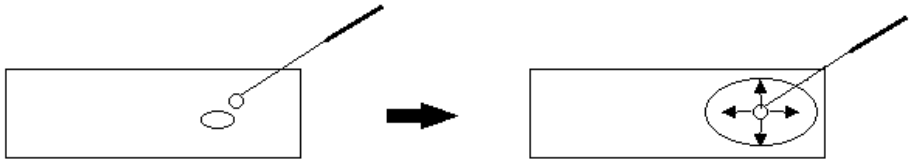


Figura 3. Extensión de la muestra mixta al lado derecho de la lámina. A. Procedimiento para tomar una gota del cultivo mixto en condiciones asépticas. B. Procedimiento para colocar y extender el cultivo mixto al lado derecho de la lámina.

Vuelva a flamear el asa para eliminar los microorganismos del cultivo control.

b. Extensión del cultivo puro de la bacteria incógnita

Antes de realizar la preparación del cultivo puro, flamee nuevamente el asa y deje que se enfríe para eliminar cualquier microorganismo del ambiente que haya podido contaminarla.

Tome una gota de solución salina estéril y transfiérala al lado izquierdo de la lámina en la que extendió el control.

Flamee nuevamente el asa y deje que se enfríe.

Con el asa flameada toque una colonia de un cultivo puro de una bacteria incógnita y resuspenda la porción de colonia en la gota de agua del lado izquierdo del portaobjetos. **Extiéndala por al menos una pulgada de largo y media de ancho, para obtener una buena separación de las células bacterianas** (figura 4.B). El frotis debe quedar como una capa fina apenas perceptible que no se debe traslapar con el frotis del cultivo mixto.

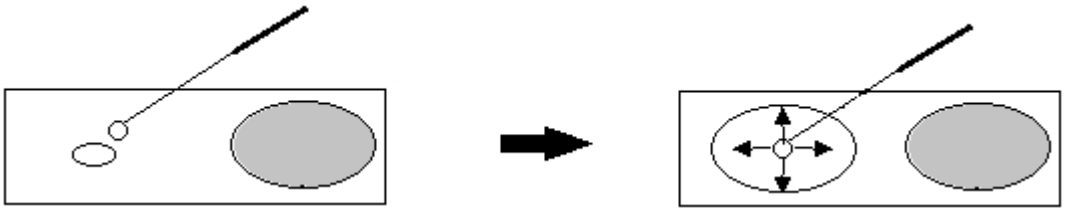


Figura 4. Extensión del cultivo puro al lado izquierdo de la lámina, **por al menos una pulgada de largo y media de ancho, para obtener una buena separación de las células bacterianas**.

La preparación se debe dejar secar por completo al aire antes de fijarla. Esto toma varios minutos. Para agilizar el proceso de secado, se puede colocar la lámina cerca del mechero, pero NO se debe flamear si aún no está seca, ya que esto genera aerosoles que pueden ingresar a su organismo por la vía respiratoria.

Cuando las extensiones estén completamente secas se fijan con calor, pasando la lámina **ligeramente tres veces por la llama con la preparación hacia arriba** (figura 5). No caliente la lámina en exceso porque se forman aerosoles.

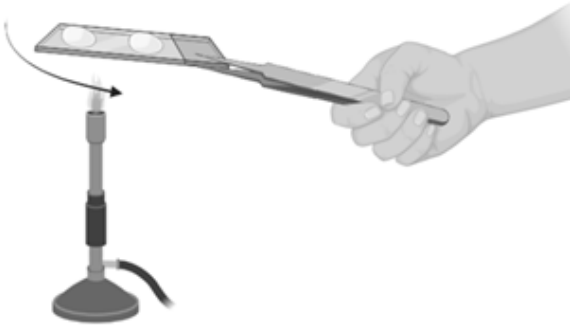


Figura 5. Fijación por flameado.

Coloque las láminas en la rejilla de la pila y proceda al inicio de la tinción.

3. Tinción

Cubra **completa y abundantemente** los frotis con cristal violeta de Hucker por un minuto (figura 6).

Lave con agua del tubo suavemente y escurra el exceso de agua (sin secar con papel toalla).

Cubra **completa y abundantemente** los frotis con Lugol por un minuto.

Lave con agua del tubo y escurra el exceso (sin secar con papel toalla).

Ponga la lámina **en posición completamente vertical** y agregue el decolorante sobre la preparación hasta que ya no suelte color. Esto toma **unos pocos segundos**. Lave **inmediatamente** con abundante agua del tubo para remover por completo el decolorante. Este es el paso más crítico de toda la tinción. Si deja el decolorante por mucho tiempo o si no lo lava bien, se van a teñir mal las bacterias Gram positivas. Si no lo deja suficiente, se van a teñir mal las bacterias Gram negativas.

Escurra el exceso de humedad (sin secar con papel toalla) y vuelva a colocar la lámina en la rejilla de la pila.

Cubra **completa y abundantemente** los frotis con safranina por un minuto. Luego lave con agua y escurra, deje secar al aire. Esto puede tomar varios minutos. Para agilizar el proceso de secado puede ayudarse suavemente con papel toalla o bien colocar las láminas dentro de la incubadora o en la mesa de trabajo bajo el campo estéril del mechero, pero sin volverlas a flamear.

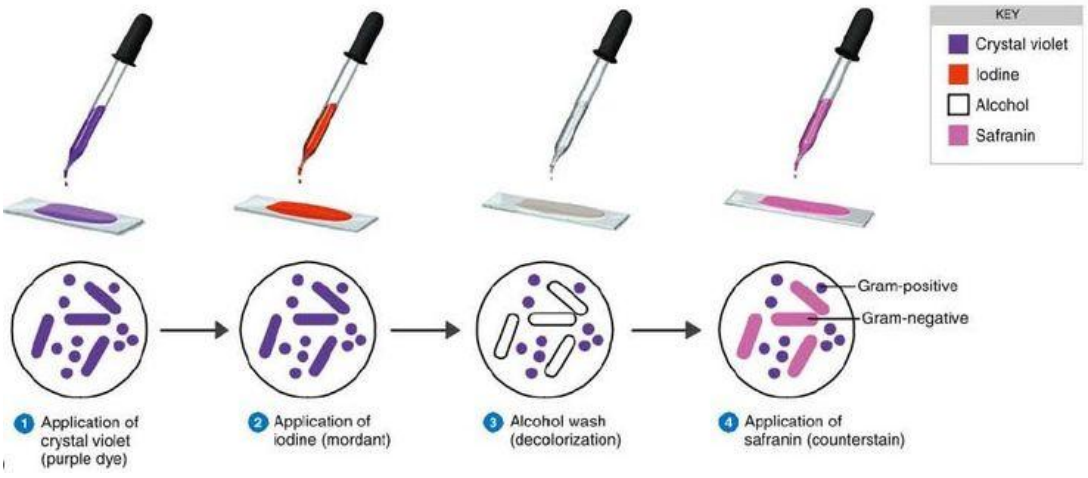


Figura 6. Pasos de la tinción de Gram.

4. Visualización al microscopio óptico

Examine al microscopio primero con los objetivos secos y finalmente con el de inmersión. Tenga cuidado de no llenar los objetivos secos con aceite de inmersión.

Corrobore que las bacterias del frotis control presenten las morfologías y colores esperados. Compare con la morfología y color de la bacteria incógnita. Anote los resultados en su bitácora.

Una vez que termine de utilizar el microscopio debe limpiar el lente de 100 x con el papel para lentes.

Cuestionario

1. ¿En qué tipo de diferencias estructurales se basa la tinción de Gram?

2. ¿De qué color se vería una bacteria Gram positiva y una Gram negativa si no se utilizara el decolorante durante la tinción?

3. ¿Qué le haría sospechar que una bacteria que se tiñó como Gram negativa es en realidad Gram positiva?

4. Cite 5 aspectos a tomar en cuenta al realizar la tinción de Gram para que los resultados sean confiables.

5. Investigue acerca del método independiente de tinción a base de KOH para diferenciar bacterias Gram positivas y Gram negativas. ¿Qué ventajas y desventajas presenta en comparación con la tinción?

Referencias

Gamazo, C., López-Goñi, I., Díaz, R. (2005). *Manual práctico de Microbiología*. 3era Edición. España, Editorial Elsevier.

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P.V. & Clark, P.C. (2009). *Brock: Biología de los Microorganismos*. 12 Edición. Madrid, Editorial Prentice Hall.

Mahon C. R., Manuselis G. (2000). *Textbook of Diagnostic Microbiology*. Second Edition. United States of America, W.B. Saunders Company.

Montero, V. (2008). *Manual de Prácticas de Laboratorio Microbiología Aplicada*. Instituto Tecnológico de Costa Rica.

Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A. (1996). *Microbiology*. Third Edition. United States of America, Wm. C . Brown Publishers.

Rodríguez, E., Gamboa, M.M., Hernández, F. & García, J.D. (2005). *Bacteriología general: Principios y prácticas de laboratorio*. San José, Editorial Universidad de Costa Rica.

Rojas, N., Chaves, E., García, F. (2006). *Bacteriología Diagnóstica*. Recuperado de http://www.infectologiapediatrica.com/attachments/bacteriologia_diagnostica.pdf

PRÁCTICA 4. MÉTODOS PARA EVIDENCIAR LA OMNIPRESENCIA DE MICROORGANISMOS

Introducción

Los microorganismos se encuentran en el agua, el aire, el polvo, el suelo, las plantas, los animales, el cuerpo humano, e incluso en ambientes hostiles donde no existe ningún otro tipo de vida como los volcanes y las profundidades marinas.

En general proliferan con facilidad donde encuentran alimento, humedad y una temperatura adecuada para su desarrollo.

Como las condiciones que favorecen la supervivencia y el desarrollo de muchos microorganismos son las mismas en las cuales usualmente se desenvuelven las personas, es inevitable que vivamos en medio de una multitud de microorganismos.

Algunos conviven con el ser humano constituyendo la microbiota, cuya presencia es beneficiosa para nuestro organismo. Sin embargo, estos microorganismos pueden ser potencialmente patógenos cuando invaden otros sitios anatómicos diferentes a los que habitan normalmente. Además, pueden diseminarse desde nuestro cuerpo al ambiente a través de secreciones, aerosoles y excreciones de individuos enfermos, portadores asintomáticos.

En esta práctica se realizarán aislamientos primarios, es decir se aislarán microorganismos a partir de las muestras indicadas en el procedimiento. Se espera entonces obtener diferentes tipos de microorganismos creciendo simultáneamente en una misma placa Petri, lo cual se evidenciará mediante la obtención de colonias con diferentes características (tamaño, color, forma, borde liso o irregular, consistencia seca o húmeda, etc.).

El siguiente paso en el estudio y caracterización de los microorganismos obtenidos, consiste en establecer un cultivo puro de cada tipo de colonia, o por lo menos de los que se consideren de interés. Para ello se utiliza la técnica de rayado, la cual se basa en tomar un inóculo o porción de colonia de interés y distribuirlo sobre la superficie de un medio de cultivo nuevo usando el asa bacteriológica. El objetivo de la técnica de rayado consiste en obtener colonias del mismo tipo que crezcan separadas en la superficie del medio. La calidad del rayado depende directamente de la cantidad de inóculo que se siembra y de la destreza de la persona que lo realiza. Se debe procurar en todo momento emplear técnica aséptica y utilizar al máximo de la superficie del agar, así como realizar los trazos lo más seguido posible, pero sin que se traslapen. En esta práctica se realizará un rayado a partir de una muestra de microorganismos, para que el estudiante pueda practicar esta técnica de purificación.

Objetivo

Aplicar diferentes técnicas de muestreo para evidenciar la omnipresencia de los microorganismos.

Materiales

Botellas de Agar de recuento estándar (ARE)
Botellas de Agar papa dextrosa (APD)
Placas de Petri estériles
Una placa de agar sangre
Agar MacConkey (AMC)
Dos tubos de hisopos estériles
Caldo nutritivo (CN)
Placa de Agar sangre (AS)
Ácido Tartárico
Mezcla de microorganismos para separación por rayado

Procedimiento

1. Muestreo ambiental grupal

Tome una placa de ARE y otra de APD, quíteles la tapa y expóngalas al aire del laboratorio durante 20 minutos. No olvide rotular adecuadamente la base de la placa de Petri con las iniciales y el experimento correspondiente.

Incube las placas en posición invertida a 35 °C por 48 horas. Transcurrido este tiempo lea los resultados y repórtelos en su cuaderno de laboratorio.

2. Muestreo de dedos sucios y limpios individual

Tome una placa de ARE y con un marcador permanente trace una línea que divida la parte inferior de la placa en dos partes iguales.

Pase un dedo sucio sobre la superficie de una mitad de la placa y rotule por la parte de atrás.

Lávese las manos y pase un dedo limpio sobre la superficie de la otra mitad de la placa.

Rotule las placas con el experimento y las iniciales del grupo e incúbelas en posición invertida a 35 °C por 48 horas. Transcurrido este tiempo lea los resultados y repórtelos en su cuaderno de laboratorio.

3. Muestreo de la cabellera grupal

Tome una placa de ARE y destápela. Sacuda su cabellera sobre la superficie del agar. Vuelva a tapar la placa.

Rotule la placa con el experimento y las iniciales del grupo. Incube en posición invertida a 35 °C por 48 horas. Transcurrido este tiempo lea los resultados y repórtelos en su bitácora.

4. Muestreo de superficies grupal

Tome un hisopo estéril y sumérjalo en CN. Con el hisopo húmedo tome una muestra de alguna superficie como por ejemplo una pared, una puerta, una ventana, una porción de la mesa de trabajo, etc.

Luego pase el hisopo suavemente sobre la superficie de una placa de APD.

Rotule la placa con el nombre del experimento y las iniciales del grupo e incube en posición invertida a 35 °C por 48 horas. Transcurrido este tiempo lea los resultados y repórtelos en su cuaderno de laboratorio.

5. Muestreo del rostro individual

Tome un hisopo estéril y sumérjalo en CN. Con el hisopo húmedo tome muestra de la cara, bigote o borde del pelo y pase el hisopo suavemente sobre la superficie de una placa de AS.

Rotule la placa con el nombre del experimento y las iniciales del grupo e incube en posición invertida a 35 °C por 48 horas. Transcurrido este tiempo lea los resultados y repórtelos en su cuaderno de laboratorio.

6. Técnica de rayado individual para separación de colonias

Rotule adecuadamente una placa de AMC.

Flamee el asa, espere a que enfríe.

Tome una pequeña porción de colonia del cultivo a rayar.

Divida mentalmente la placa de AMC en tres secciones como se muestra en la figura 7.

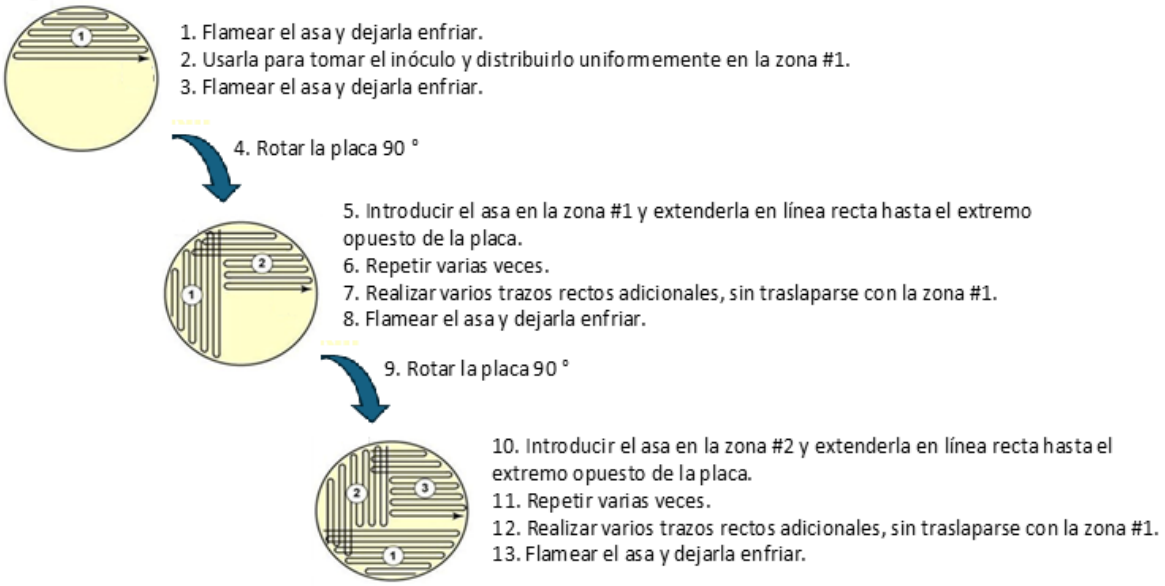


Figura 7. Técnica de rayado para tres zonas. Si se desean realizar cuatro zonas, se hacen más pequeñas estas zonas y se agrega una adicional.

En la zona #1, distribuya el inóculo uniformemente, con trazos lineales seguidos de lado a lado (como si estuviera coloreando un dibujo). Tenga cuidado de no romper el agar.

Flamee nuevamente el asa y espere a que enfríe.

Gire la placa en un ángulo de aproximadamente 90°.

Arrastre hacia la zona #2, las bacterias que puso en la zona #1. Para ello ingrese unas 3 veces con el asa a la zona #1, para cargarla con las bacterias previamente agregadas a esa zona y distribúyalas uniformemente hacia la zona #2, con trazos lineales seguidos.

NOTA: Para inocular una nueva zona del rayado, **nunca debe volver a tomar bacterias del cultivo crecido que usó para inocular la zona #1.** Por el contrario, lo que debe hacer es ir distribuyendo las que recién fueron inoculadas en la zona anterior y aún no han crecido. Puede guiarse con las marcas que deja el asa en la superficie del medio. El rayado disminuirá progresivamente la concentración de bacterias en cada zona, lo que hará posible luego del periodo de incubación, obtener colonias aisladas en la última zona.

Flamee nuevamente el asa y espere a que enfríe.

Gire la placa en un ángulo de aproximadamente 90 °.

Distribuya una pequeña porción del inóculo de la zona #2 hacia la zona #3 de la placa ingresando unas 3 ó 4 veces con el asa bacteriológica.

Incube las placas a 35 °C por 24 horas en posición invertida.

Transcurrido el periodo de incubación observe el crecimiento bacteriano. Idealmente debe tener aproximadamente diez colonias aisladas en la última zona, que es la que recibe la menor concentración de bacterias si el rayado se hace correctamente.

Cuestionario

1. ¿Por qué la convivencia de los microorganismos y las personas es tan estrecha?

2. Explique ¿por qué se deben incubar las placas con la tapa hacia abajo?

3. ¿Porque la placa de manos sucias contiene menos microorganismos que la de manos limpias?

4. ¿Qué relación tiene la hemólisis con la patogenicidad?

Referencias

Arias, M.L, Antillón, F., Chaves, C. & Villalobos, L. (2008). *Microbiología de aguas y alimentos. Principios y prácticas de laboratorio*. San José, Editorial Universidad de Costa Rica.

Montero, V. (2008). *Manual de Prácticas de Laboratorio Microbiología Aplicada*. Instituto Tecnológico de Costa Rica.

Rodríguez, E., Gamboa, M.M., Hernández, F. & García, J.D. (2005). *Bacteriología general: Principios y prácticas de laboratorio*. San José, Editorial Universidad de Costa Rica.

PRÁCTICA 5. INTRODUCCIÓN AL ESTUDIO DE LOS HONGOS

Introducción

Los hongos son organismos eucariotas principalmente de origen terrestre, aunque algunos también pueden encontrarse en agua dulce y salada.

Los hongos del suelo tienen un papel fundamental a nivel ecológico y ambiental como descomponedores de materia orgánica. Sin embargo, algunos hongos del suelo son importantes patógenos vegetales, ya que alrededor de cinco mil especies fúngicas atacan cultivos de importancia económica, ornamental y silvestre.

También existen hongos que son patógenos oportunistas para los animales y el ser humano. Esto significa que infectan principalmente individuos con inmunosupresión como por ejemplo los enfermos de SIDA, los pacientes con cáncer o las personas transplantadas, quienes son altamente susceptibles a padecer infecciones por hongos a nivel pulmonar, urinario, ocular, cutáneo y del sistema nervioso central.

Por otra parte, algunos hongos tienen utilidad biotecnológica y son esenciales para los procesos industriales que involucran fermentaciones, por ejemplo, la fabricación de pan, licores, quesos, salsa de soya, ácido cítrico y algunas drogas como la cortisona y la penicilina. Otros por el contrario ocasionan importantes pérdidas económicas por deterioro cuando contaminan cierto tipo de alimentos y productos industriales. Cabe mencionar que algunos hongos producen toxinas, denominadas micotoxinas, que causan envenenamiento al ser ingeridas por el ser humano y por los animales.

Los hongos se clasifican en tres grandes grupos que son los hongos filamentosos, las levaduras y las setas.

El estudio de las características morfológicas de los hongos, macroscópicas y microscópicas de cada grupo, constituye un elemento importante para su identificación en cuanto a género y especie.

Entre las características macroscópicas más importantes está la rapidez del crecimiento, tipo de colonia, color, aspecto y pigmentos. Entre las características microscópicas más importantes están hifas, tabiques, esporas, blastosporas y otras formas específicas de cada género.

Objetivo

Aplicar técnicas para el cultivo y reconocimiento de estructuras de diferentes tipos de hongos.

Materiales

Cultivos de hongos filamentosos y levaduras
Microscopio
Estereoscopio
Agar Papa Dextrosa
Azul de lactofenol
Asa micológica
Porta y cubreobjetos

Procedimiento

1. Características macroscópicas

Examine las características macroscópicas de los hongos suministrados (utilice el estereoscopio), haga dibujos de cada uno en su cuaderno.

2. Características microscópicas

Para cada tipo de hongo, tome con el asa micológica una pequeña porción de micelio y colóquela sobre un portaobjetos. Asegúrese de incluir micelio vegetativo y no únicamente esporas. Evite arrastrar agar.

Agregue el colorante azul de lactofenol para teñir las células de los hongos.

Coloque cuidadosamente un cubreobjetos y observe al microscopio de luz.

Dibuje en su cuaderno las estructuras características que observa para cada género de hongo según lo explicado por su profesor(a). Puede que sea necesario realizar varios montajes hasta obtener laminas con estructuras características de cada género. No se desanime si no lo logra al primer intento.

3. Cultivo

Flamee el asa micológica y espere a que enfríe. Utilizando la técnica aséptica, busque el borde de las colonias de los cultivos que se le suministren y corte con el asa micológica una porción cuadrada de colonia de aproximadamente 2 mm de ancho y largo. Inocule la porción de colonia en Agar Papa Dextrosa.

NOTA: Es importante que trabaje con técnica aséptica y que evite inocular zonas esporuladas, ya que las esporas se diseminan muy fácilmente por el aire y ocasionan problemas de contaminación en el laboratorio.

Rotule los tubos con el nombre del hongo, las iniciales y la fecha.

Incube a temperatura ambiente durante una semana.

Cuestionario

1. Mencione la importancia industrial de los hongos.

2. Cite 3 características biotecnológicas importantes que se le atribuye a los hongos.

3. ¿Cómo determinaría que una contaminación de un cultivo bacteriano es producida por *Candida sp*?

4. Mencione las estructuras microscópicas diferenciales entre los géneros *Penicillium* sp, *Aspergillus* sp y *Rhizopus* sp.

5. Explique una aplicación ambiental específicamente en biorremediación de los hongos.

Referencias

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P.V. & Clark, P.C. (2009). *Brock: Biología de los Microorganismos*. 12 Edición. Madrid, Editorial Prentice Hall.

Montero, V. (2008). *Manual de Prácticas de Laboratorio Microbiología Aplicada*. Instituto Tecnológico de Costa Rica.

Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A. (1996). *Microbiology*. Third Edition. United States of America, Wm. C . Brown Publishers.

Santamaría, P., Roselló, J. & García, F.J. (2004). *Prácticas de Biología y Botánica*. Valencia, Editorial Universidad Politécnica de Valencia.

PRÁCTICA 6. TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN BACTERIANA

Introducción

En microbiología se han desarrollado esquemas de identificación bacteriana basados en características bioquímicas, los cuales por lo general implican la realización de gran cantidad de pruebas en placas de Petri o tubos de ensayo.

Sin embargo, también existen sistemas miniaturizados que utilizan tiras de policarbonato con varios microtubos, lo que se conoce como galería. Cada microtubo de la galería contiene los reactivos químicos necesarios para realizar un tipo específico de prueba bioquímica. Esto permite hacer varias pruebas en un espacio muy reducido, en comparación con el espacio que ocuparía una gradilla con un tubo de ensayo para cada prueba.

Entre los sistemas miniaturizados más difundidos, por su rapidez y facilidad de uso, destacan los denominados "Api" producidos por la casa comercial francesa Biomérieux.

En el siguiente cuadro se ejemplifican algunos de los sistemas Api disponibles comercialmente, así como los grupos bacterianos que identifica cada uno.

Cuadro 1. Ejemplos de sistemas Api® para la identificación bacteriana.

Sistema	Características
API 20E	Identificación de bacterias de la familia Enterobacteriacae y de algunas bacterias no fermentadoras
API 20NE	Identificación de bacterias Gram negativas que no pertenecen a la familia Enterobacteriaceae
API 20 Strep	Identificación de especies de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus*
API Staph	Identificación de las especies clínicas del género *Staphylococcus* y *Micrococcus*
API 20A	Identificación de bacterias anaerobias

En esta práctica se utilizará el sistema Api 20E, el cual consta de 21 pruebas bioquímicas estandarizadas y miniaturizadas. Cada tira de API 20E contiene 20 microtubos con distintos sustratos deshidratados. Cada tubo es una prueba bioquímica distinta. La prueba número 21, se llama "oxidasa" y se hace de forma independiente a la tira. Las galerías de microtubos se inoculan con el microorganismo a identificar y en aproximadamente 24 horas se lee el resultado de las pruebas bioquímicas. Este resultado genera un código que sirve para identificar al microorganismo mediante comparación, manual o digital, con una base de datos que incluye los perfiles de bacterias comunes y atípicas. En el siguiente cuadro se detallan las pruebas que contiene el sistema Api 20E, así como la respectiva lectura e interpretación de resultados.

Cuadro 2. Pruebas del sistema Api 20E.

Prueba	Reacción / Enzimas	Resultado	
		Negativo	**Positivo**
ONPG	Beta-galactosidasa	sin color	amarillo
ADH	Arginina deshidrolasa	amarillo	rojo o naranja
LDC	Lisina descarboxilasa	amarillo	rojo o naranja
ODC	Ornitina descarboxilasa	amarillo	rojo o naranja
CIT	Utilización del citrato	verde	azul oscuro o turquesa
H2S	Producción de H_2S	sin precipitado negro	precipitado negro
URE	Ureasa	amarillo	rojo o naranja
TDA	Triptófano desaminasa	amarillo	marrón-rojo
IND	Producción de indol	amarillo	color rosa o anillo rosa-rojo
VP	Producción de acetoína (Voges-Proskauer)	sin color	rosa-rojo
GEL	Gelatinasa	sin difusión	difusión de pigmento
GLU	Fermentación/oxidación de glucosa	azul o verde	amarillo
MAN	Fermentación/oxidación de manitol	azul o verde	amarillo
INO	Fermentación/oxidación de inositol	azul o verde	amarillo
SOR	Fermentación/oxidación de sorbitol	azul o verde	amarillo
RHA	Fermentación/oxidación de ramnosa	azul o verde	amarillo
SAC	Fermentación/oxidación de sacarosa	azul o verde	amarillo
MEL	Fermentación/oxidación de melobiosa	azul o verde	amarillo
AMY	Fermentación/oxidación de amigdalina	azul o verde	amarillo
ARA	Fermentación/oxidación de arabinosa	azul o verde	amarillo
OX	Citocromo oxidasa		

El sistema Api 20E específicamente se ha convertido en el método de referencia contra el cual se compara la precisión de otros métodos miniaturizados.

Objetivo

Aplicar métodos bioquímicos miniaturizados para la identificación de bacterias.

Materiales

Tiras y reactivos para Api 20 E
Cultivos bacterianos por identificar
Tubos con 5 mL de solución salina estéril (0.85% NaCl)
Estándar de McFarland 0.5
Tarjeta Wickerham
Micropipetas
Puntas para micropipeta estériles
Aceite mineral

Procedimiento

1. Preparación de la cámara de humedad

El sistema API 20E contiene una cámara de policarbonato compuesta por una tapa y una base. Esta última posee una lengüeta para rotulación y unas pequeñas cavidades en el fondo.

La función de esta cámara consiste en crear un ambiente de humedad para evitar que las pruebas se deshidraten durante el periodo de incubación.

Para preparar la cámara de humedad, proceda a rotular la lengüeta de la base con las iniciales del grupo y con el código de la incógnita asignada.

Llene todas las cavidades de la base con agua destilada, evitando que el líquido se desborde. Si esto ocurre, debe secar el exceso con papel toalla.

2. Estandarización del inóculo

Con el asa bacteriológica, transfiera **inicialmente una colonia** de la incógnita bacteriana correspondiente a un tubo con solución salina estéril. Realice una suspensión bacteriana homogénea y compare visualmente su turbidez con la de un estándar de McFarland 0.5, con ayuda de una tarjeta Wickerham, como se observa en la siguiente figura.

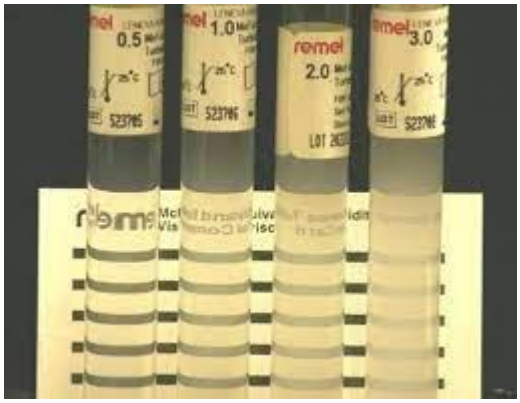


Figura 8. Comparación visual de la turbidez de diferentes estándares de McFarland con ayuda de la tarjeta Wickerham. Esta tarjeta consiste en una hoja o cartón blanco que tiene impresas o dibujadas varias rayas negras gruesas y horizontales. El objetivo de la tarjeta es crear un contraste para observar mejor la turbidez de los tubos transparentes. La turbidez del Estándar de McFarland 0.5 es equivalente a la turbidez de una suspensión bacteriana que se encuentra a una concentración de 1.5 x 10^8 células bacterianas por mL.

NOTA: Es muy importante que la turbidez del inóculo sea muy similar a la del estándar. Si se ve menos turbio, quedará muy diluido, de manera que la prueba Api 20E no se podrá leer a las 24 h. Por lo tanto, si el inóculo se observa menos turbio, se le deberá agregar otra colonia bacteriana y volver a resuspender y comparar la turbidez. Por el contrario, si el inóculo se ve más turbio que el estándar, quedará muy concentrado, lo cual también afectará el resultado de la prueba API 20E, induciendo a errores en la lectura e interpretación. Por lo tanto, si el inóculo se observa más turbio, se le debe agregar más solución salina hasta que se vea lo más parecido posible al estándar.

Mantenga la asepsia en todo momento, dado que la contaminación del inóculo compromete la validez de los resultados y la identificación de la bacteria.

3. Inoculación de la galería

Como se muestra en la siguiente figura, todos los microtubos de la galería del API 20 E presentan una forma como de zapato tipo bota, con dos partes, una llamada “tubo” y otra “cúpula”.

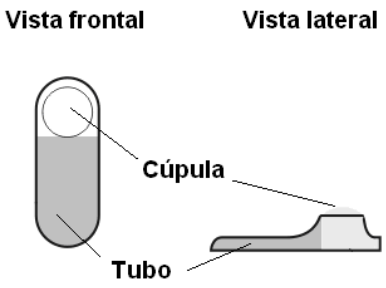


Figura 9. Vista frontal y lateral de los microtubos del Api 20E.

Las pruebas que están encerradas por un recuadro (CIT, VP y GEL) deben llenarse con el inóculo hasta la cúpula, las demás pruebas se llenan solamente hasta el tubo. Las pruebas que están subrayadas (ADH, LDC, ODC, URE y H_2S) son pruebas que deben llevarse a cabo en anaerobiosis, por lo tanto, se debe llenar el tubo con el inóculo y la cúpula con aceite mineral. A continuación, se ilustra la preparación de la galería.

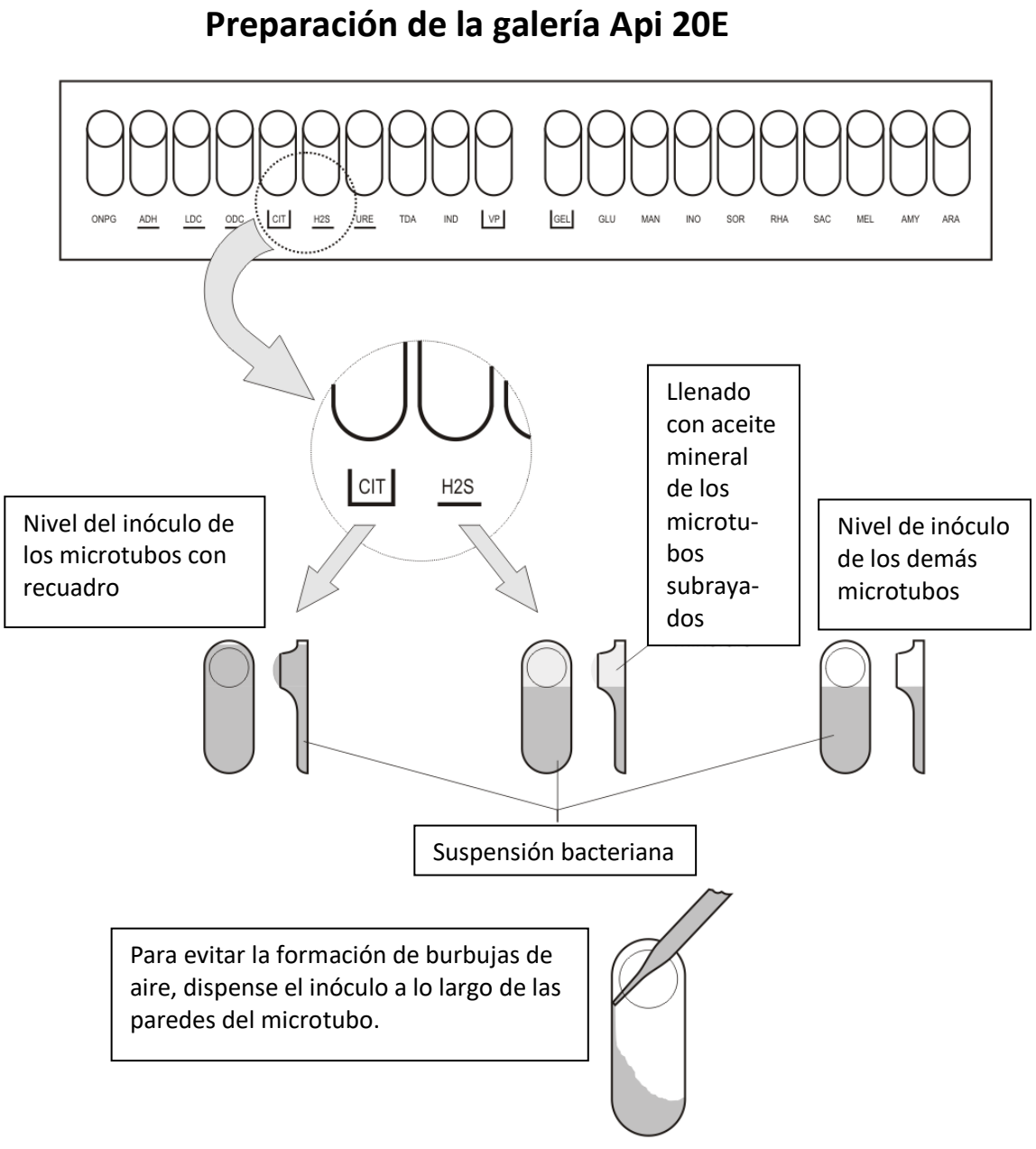


Figura 10. Preparación de la galería Api 20E.

3. Incubación de la galería

La galería inoculada se debe colocar dentro de la cámara de humedad e incubar por 24 horas a 35 °C.

4. Lectura de los resultados

El sistema Api 20 E viene acompañado de una plantilla para la lectura de los resultados, la cual se muestra a continuación.

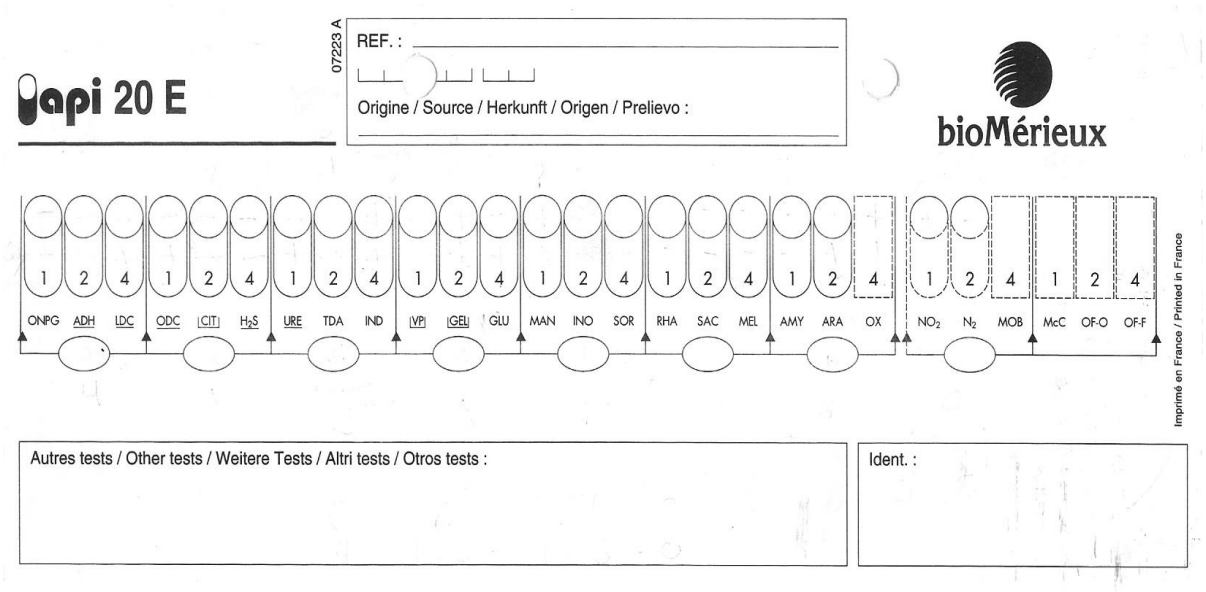


Figura 11. Plantilla para la lectura de los resultados del Api 20E.

Transcurrido el periodo de incubación proceda a sacar la galería de la incubadora y observe los cambios en la coloración de los microtubos. Algunas pruebas se pueden leer inmediatamente según lo descrito en el cuadro 2. Sin embargo, otras como TDA, VP e IND requieren la adición de reactivos especiales para conocer el resultado de cada una.

En los microtubos de TDA e IND, adicione *RESPECTIVAMENTE* una gota del reactivo TDA y una gota del reactivo de Kovacs. Observe los cambios de color e interprete los resultados según lo descrito en el cuadro 2.

En el microtubo de VP adicione una gota del reactivo VP1 y una gota del reactivo VP2. Observe los cambios de color e interprete los resultados según el cuadro 2.

Para cada prueba complete la plantilla con los símbolos “+” y “-” según el resultado. Seguidamente, por cada tres pruebas, si hay resultados positivos, sume los valores indicados en la plantilla. Ejemplo: en la tripleta ONPG, ADH, LCD, si las dos primeras pruebas son positivas y la última negativa, el número correspondiente a esta tripleta se obtiene sumando 1+2, lo cual es igual a 3.

Luego de asignar todos los valores de las tripletas, se obtiene el código correspondiente a la incógnita, el cual se debe buscar en la base de datos del sistema para conocer la identificación.

Cuestionario

1. Investigue sobre el hábitat y patogenicidad de la bacteria incógnita que le tocó identificar.

2. ¿Qué otros métodos de identificación bacteriana existen además del sistema Api 20E?

Referencias

www.**biomerieux**.com

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P.V. & Clark, P.C. (2009). *Brock: Biología de los Microorganismos*. 12 Edición. Madrid, Editorial Prentice Hall.

Montero, V. (2008). *Manual de Prácticas de Laboratorio Microbiología Aplicada*. Instituto Tecnológico de Costa Rica.

Rodríguez, E., Gamboa, M.M., Hernández, F. & García, J.D. (2005). *Bacteriología general: Principios y prácticas de laboratorio*. San José, Editorial Universidad de Costa Rica.

PRÁCTICA 7. AISLAMIENTO DE BACTERIOFAGOS

Introducción

Los bacteriófagos o "fagos" son virus altamente específicos que infectan un tipo de cepa bacteriana en particular.

Fueron descubiertos de forma independiente por Frederick Twort en 1915 y Felix d´Herrelle en 1917.

Su ciclo de infección puede ser lítico, cuando el fago se replica y lisa la célula hospedera liberando nuevas partículas virales, o lisogénico, cuando el genoma viral se integra al cromosoma bacteriano como profago y se replica junto con él.

Debido a su alta especificidad y capacidad de replicación en el hospedero, los fagos son herramientas fundamentales en microbiología para el aislamiento y tipificación bacteriana, estudios de genética molecular y como alternativa terapéutica frente a bacterias resistentes a antibióticos. Tienen un rol importante en la regulación del balance microbiano de los ecosistemas, así como un papel clave en la evolución de la diversidad microbiana.

En esta práctica se realizará el aislamiento de bacteriófagos a partir de una muestra de aguas residuales. En una primera etapa, se aislará una cepa de *E. coli* utilizando medios selectivos y diferenciales. Posteriormente, esta cepa se empleará como hospedera para aislar, a partir de la misma muestra, un bacteriófago específico contra ella. Esta estrategia experimental aumenta la probabilidad de identificar una dupla hospedero–fago específica, debido a la co-ocurrencia natural de ambos en un mismo nicho ecológico.

Durante la etapa de aislamiento del bacteriófago, es necesario eliminar todas las bacterias presentes en la muestra mediante filtración a través de un filtro de jeringa de 0,22 µm. No obstante, debido a que las muestras de aguas residuales suelen contener una elevada cantidad de sólidos suspendidos, puede ser necesario llevar a cabo etapas preliminares de centrifugación y filtración utilizando filtros de mayor tamaño de poro, con el fin de evitar la saturación del filtro de 0,22 µm. Este último permite la eliminación de las bacterias presentes en la muestra, de manera que el filtrado final conserva los distintos tipos de bacteriófagos presentes al momento de la colecta. Estos se deben incubar con una suspensión concentrada de la bacteria hospedera, para favorecer la interacción hospedero-patógeno y poder aislar un bacteriófago específico contra esa bacteria.

Posteriormente, se procede a la fase de cultivo en placa, en la cual se realiza un aislamiento por vaciado. Para ello, se mezclan las bacterias incubadas con los bacteriófagos con Agar de Recuento Estándar fundido. Una vez solidificado, es conveniente adicionar una segunda capa delgada de agar con el fin de aumentar el contraste y facilitar la visualización de las calvas producidas por los bacteriófagos. Estas se observan como zonas circulares

translúcidas, resultado de la lisis bacteriana, rodeadas por crecimiento bacteriano visible como áreas más turbias y opacas.

El aislamiento de colífagos, es decir, bacteriófagos específicos contra *E. coli*, en aguas residuales tiene relevancia microbiológica tanto a nivel sanitario como de investigación. Entre sus principales aplicaciones destaca su uso como indicadores de contaminación fecal asociada a virus entéricos humanos, debido a su resistencia ambiental y a su comportamiento similar al de estos virus. Asimismo, permiten evaluar la eficacia de los procesos de tratamiento y desinfección del agua. Además, constituyen modelos útiles para estudiar la persistencia, inactivación y dinámica ecológica de virus en ambientes acuáticos, así como las interacciones hospedero–fago en condiciones naturales.

Objetivo

Aplicar técnicas para el aislamiento de bacteriófagos a partir de una muestra ambiental.

Materiales

Muestra de agua residual
Tubos de ensayo conteniendo 9 ml de solución salina estéril
Micropipetas de 100 y 1000 µl con puntas estériles
Medios selectivos y diferenciales para *E. coli*
Medio general
Reactivos para tinción e identificación de *E. coli*
Centrífuga
Filtros de café
Filtros de papel Whatman
Filtros de jeringa de 0.22 µm
Tubos de ensayo estériles
Tubos de ensayo con 10 mL de agua peptonada
Micropipetas
Puntas de micropipeta
Agar de recuento estándar fundido
Baño María
Placas de Petri estériles
Esteroscopio

Procedimiento

1. Aislamiento de la cepa de *E. coli* hospedera

Homogenice la muestra de agua residual y prepare diluciones seriadas 1:10 en solución salina estéril hasta 10-3.

Siempre por extensión 100 µL de cada dilución en placas de agar MacConkey. Rotule adecuadamente e incube 24 horas a 35 °C.

Transcurrido este tiempo, examine las placas en busca de colonias sugestivas de *E. coli* (color rosado con un ombligo en el centro).

Con el asa de punta, pique una de estas colonias. Procure seleccionar una que se encuentre bien aislada. Realice un rayado para purificación en otra placa de Agar MacConkey. Incube 24 horas a 35 °C.

Realice un rayado en medio general e incube 24 horas a 35 °C.

Realice una tinción de Gram. Si la bacteria corresponde a un bacilo Gram negativo, realice la prueba de oxidasa. Si es negativa, proceda a montar un API 20 E para confirmar la identificación del aislamiento como *E. coli*. Almacene la cepa en refrigeración hasta su uso.

2. Preparación de la muestra

Su profesor(a) inspeccionará visualmente la muestra para estimar si la presencia de sólidos suspendidos podría saturar el filtro de 0.22 µM y le indicará los pasos necesarios para poder reducir estos sólidos, los cuales podrían incluir:

- Una o más centrifugaciones por 5-10 min a 4000 rpm.

- Una o más filtraciones a través de un filtro de café para eliminar sólidos más gruesos y luego a través de papel Whatman para eliminar sólidos más finos.

NOTA: Tenga presente que los procesos de filtración suelen ser lentos.

Una vez que haya reducido significativamente los sólidos suspendidos de la muestra, proceda a filtrarla, utilizando un filtro de jeringa de 0.22 µm, con el fin de eliminar las bacterias y dejar solamente las partículas virales en el filtrado final.

Por último, trasvase 10 mL del filtrado final a un tubo estéril.

3. Preparación del inóculo bacteriano

Realice una suspensión bacteriana concentrada de la bacteria hospedera en un tubo con 10 mL de agua peptonada estéril.

Mezcle la suspensión bacteriana con el filtrado final de agua residual e incube dicha mezcla por 30 minutos a 35 °C para favorecer la interacción bacteria-bacteriófago (figura 12).

4. Obtención de las calvas

Ponga a fundir 100 mL de agar de recuento estándar en un baño María. Luego mantenga el medio fundido a una temperatura de 60°C.

Distribuya la muestra de bacterias y bacteriófagos en cuatro placas Petri estériles, agregando aproximadamente 2.5 mL por placa.

Agregue una capa de agar de ARE a cada placa, mezcle con movimientos circulares suaves y deje solidificar.

Posteriormente, agregue una segunda capa delgada de ARE fundido encima de la primera ya solidificada y vuelva a dejar solidificar.

Incube en posición invertida a 35 °C por 24 horas.

Transcurrido este tiempo observe las cuatro placas con ayuda de un estereoscopio e identifique en cuales de ellas hubo crecimiento bacteriano y formación de calvas. En caso de no observar nada en ninguna placa, reincube por 24 h más y vuelva a revisar. Compare la observación de calvas con la foto proporcionada por su profesor(a).

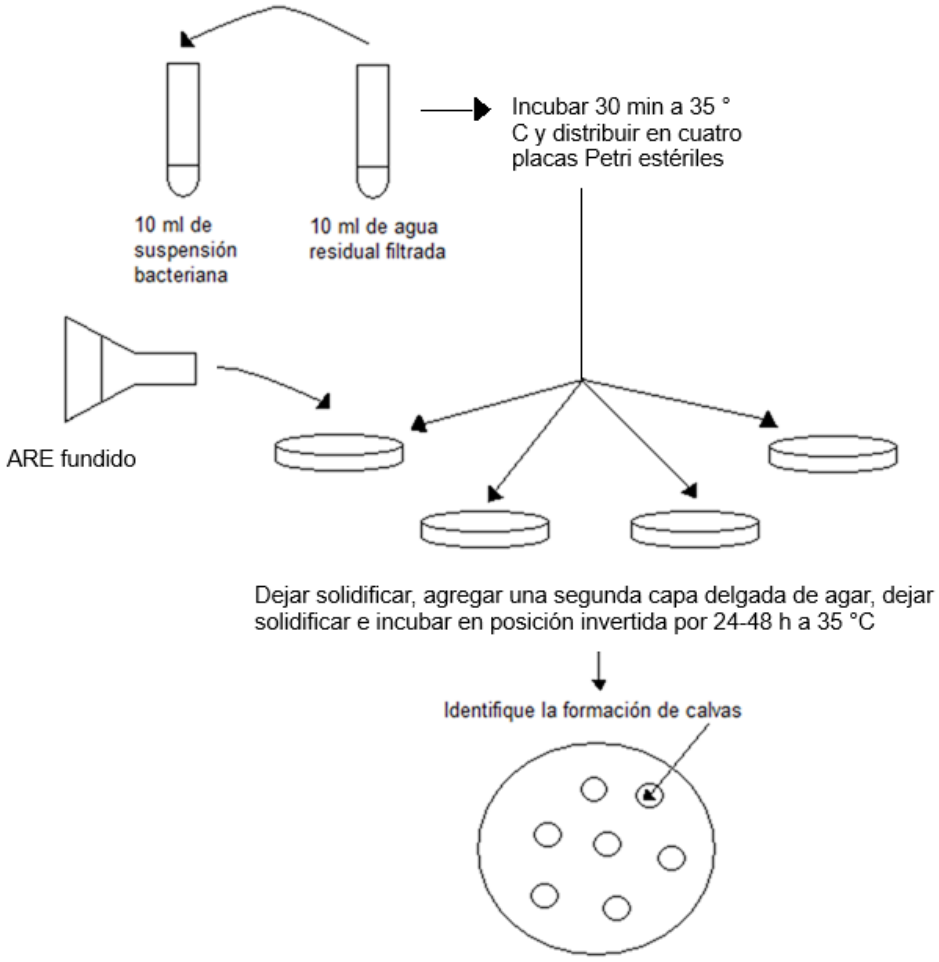


Figura 12. Esquema del procedimiento para el aislamiento de bacteriófagos.

Cuestionario

1. Investigue el papel de los fagos en las industrias a base de productos de origen bacteriano, por ejemplo, la industria de las fermentaciones lácticas o la producción de enzimas a gran escala. ¿Cómo se puede controlar su proliferación?

2. ¿En qué consiste la tecnología de "*phage display*"? Mencione al menos dos ejemplos de aplicaciones que puede tener.

Referencias

Clokie, M. R. J., Millard, A. D., Letarov, A. V., & Heaphy, S. (2011). Phages in nature. *Bacteriophage, 1*(1), 31–45. https://doi.org/10.4161/bact.1.1.14942

Howard-Varona, C., Hargreaves, K. R., Abedon, S. T., & Sullivan, M. B. (2017). Phage life histories and bacterial ecology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews, 81*(3), e00031-17. https://doi.org/10.1128/MMBR.00031-17

Hyman, P., & Abedon, S. T. (2010). Bacteriophage host range and bacterial resistance. *Advances in Applied Microbiology, 70*, 217–248. https://doi.org/10.1016/S0065-2164(10)70007-1

Kelmer, G. A. R., Ramos, E. R., & Dias, E. H. O. (2023). Coliphages as viral indicators in municipal wastewater: A comparison between the ISO and the USEPA methods based on a systematic literature review. *Water Research, 230*, 119579. https://doi.org/10.1016/j.watres.2023.119579

Koskella, B., & Brockhurst, M. A. (2014). Bacteriophage-mediated selection and the evolution of bacterial resistance. *Current Biology, 24*(20), R1013–R1023. https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.09.025

Kutter, E., & Sulakvelidze, A. (Eds.). (2005). *Bacteriophages: Biology and applications*. CRC Press.

Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V., & Clark, D. P. (2009). *Brock: Biología de los microorganismos* (12.ª ed.). Pearson Prentice Hall.

McAuliffe, O., Ross, R. P., & Fitzgerald, G. F. (2007). The new phage biology: From genomics to applications. En S. McGrath & D. van Sinderen (Eds.), *Bacteriophage: Genetics and molecular biology* (pp. 1–42). Caister Academic Press.

Singh, S., Pitchers, R., & Hassard, F. (2022). Coliphages as viral indicators of sanitary significance for drinking water. *Frontiers in Microbiology, 13*, 941532. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.941532

PRÁCTICA 8. AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS FIJADORES DE NITRÓGENO

Introducción

La fijación del nitrógeno se define como el proceso de conversión del nitrógeno atmosférico a compuestos nitrogenados.

En este proceso pueden estar involucrados microorganismos simbióticos que se reproducen en las raíces de las plantas leguminosas, así como también microorganismos no simbióticos que viven libre e independientemente en el suelo.

La enzima nitrogenasa, presente tanto en microorganismos simbióticos como no simbióticos, es la responsable de la fijación de este elemento, por medio de la reacción que se indica a continuación:

$$N_2 + 3\,H_2 \xrightarrow{\text{nitrogenasa}} 2\,NH_3$$

Nitrógeno — amoníaco

La fijación del nitrógeno no simbiótico se ha estudiado extensamente en especies del género *Azotobacter*, el cual está constituido por bacilos Gram negativos ovalados y grandes (figura 13), muy difundidos principalmente en suelos de pH neutro o alcalino.

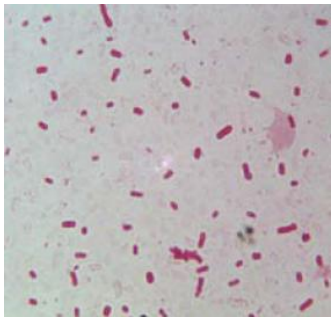


Figura 13. Morfología característica de las bacterias del género *Azotobacter*.

En esta práctica se inoculará una muestra de suelo en un caldo libre de nitrógeno con el fin de aislar microorganismos capaces de fijar el nitrógeno del aire. Posteriormente se purificarán estos microrganismos y se evaluará su efecto sobre el desarrollo de almácigos de lechuga.

Se eligió este cultivo por su rápida germinación y crecimiento. Además, es una planta con altos requerimientos de nitrógeno para su adecuado desarrollo.

Objetivos

- Aislar y purificar microorganismos fijadores de nitrógeno a partir de una muestra de suelo.
- Evaluar el efecto de los microorganismos aislados sobre el desarrollo de plántulas de lechuga.

Materiales

Muestra de suelo
Erlenmeyers de 125 mL conteniendo 20 mL de Caldo Ashby Sacarosa
Placas de Agar Ashby Sacarosa
Reactivos para tinción de Gram
Microscopios
Aceite de inmersión
Papel para lentes
Semillas de lechuga
Solución de hipoclorito de sodio al 10%
Agua destilada estéril
Algodón estéril
Placas Petri estériles
Tubos con 10 mL de caldo Ashby Sacarosa
Estándar de MacFarland 0.5
Frascos de cultivo estériles con tapa plástica
Probetas estériles
Agar Ashby Sacarosa fundido

Procedimiento

1. Aislamiento de los microorganismos fijadores de nitrógeno

Inocule 2 g de muestra de suelo en un erlenmeyer conteniendo 20 mL de caldo Ashby Sacarosa.

Incube a temperatura ambiente por una semana o hasta que observe la formación de una película fina en la superficie del caldo de cultivo.

2. Purificación

Realice una tinción de Gram a partir del crecimiento microbiano obtenido en la película superficial. Busque la morfología característica de las bacterias del género *Azotobacter* (figura 13).

Raye una placa de agar Ashby Sacarosa e incube a temperatura ambiente por una semana.

3. Evaluación del efecto de los fijadores de nitrógeno sobre el desarrollo de plántulas de lechuga

    a. Preparación del inóculo y montaje de los tratamientos a evaluar:

Revise el crecimiento microbiano obtenido en las placas de Ashby Sacarosa, observe la morfología de las colonias y realice otra tinción de Gram para corroborar la purificación del fijador de nitrógeno.

En tubos conteniendo 10 mL de Caldo Ashby Sacarosa, proceda a preparar una suspensión bacteriana concentrada. Traslade cuidadosamente esta suspensión, al invernadero donde se encuentran los almácigos de lechuga.

Cada subgrupo de trabajo dispondrá de seis almácigos de lechuga. Tres serán para evaluar el efecto de los fijadores de nitrógeno y los otros tres se utilizarán como testigo o control negativo del ensayo.

Mida y anote el tamaño de la parte superior de cada almácigo (tallo y hojas).

Agregue 3 mL de la suspensión bacteriana concentrada a cada uno de los tres almácigos destinados al experimento. Rotule como “tratamiento con fijadores de nitrógeno”, iniciales del subgrupo y fecha.

Rotule los otros tres almácigos como “testigo” o “control negativo”, las iniciales del subgrupo y la fecha.

Durante las dos semanas siguientes, proceda a regar periódicamente los almácigos.

Finalizado este periodo, mida la parte superior y radical de cada almácigo y compare los resultados obtenidos con el tratamiento y el testigo.

Cuestionario

1. ¿Cuál es la función del *Azotobacter* en la naturaleza y cuál es su producto final?

2. ¿Por qué el crecimiento de microorganismos fijadores de nitrógeno ocurre en forma de una película superficial sobre el medio líquido?

3. ¿Qué efecto se espera observar sobre el desarrollo de la plántula de lechuga con el tratamiento aplicado, a base de fijadores de nitrógeno, en comparación con el testigo?

Referencias

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P.V. & Clark, P.C. (2009). *Brock: Biología de los Microorganismos*. 12 Edición. Madrid, Editorial Prentice Hall.

Montero, V. (2008). *Manual de Prácticas de Laboratorio Microbiología Aplicada*. Instituto Tecnológico de Costa Rica.

Mylona P., K. Pawlovski, T. Bisseling. (1995). Symbiotic Nitrogen Fixation. *The Plant Cell*, 7:869-885.

Rodríguez, E., Gamboa, M.M., Hernández, F. & García, J.D. (2005). *Bacteriología general: Principios y prácticas de laboratorio*. San José, Editorial Universidad de Costa Rica.

Salazar, A.M., & Ordoñez, C.A. (2013). Aislamiento e identificación de actinomicetos fijadores de nitrógeno en suelo del jardín botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira.

PRÁCTICA 9. TÉCNICAS PARA EL AISLAMIENTO Y CUANTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS EN ALIMENTOS

Introducción

La mayoría de los alimentos que consume el ser humano se derivan de plantas y animales que están expuestos a la interacción con microorganismos. El crecimiento de los microorganismos en los alimentos puede ocasionar deterioro o transmisión de enfermedades, de manera que es importante que el estudiante pueda familiarizarse con técnicas estandarizadas para el aislamiento y cuantificación de microorganismos en los alimentos.

Normalmente en los alimentos encontramos mezclas de diferentes tipos de microorganismos que están presentes en distintas concentraciones. Por lo tanto, el estudio de un microorganismo en particular requiere que éste sea aislado del resto de microorganismos presentes en el mismo alimento. Si se presume que el microorganismo de interés está en concentraciones muy bajas, es necesario utilizar un medio de cultivo de enriquecimiento y, posteriormente, medios de cultivo selectivos y diferenciales. En esta práctica, se inoculará una muestra de natilla pasteurizada con varios tipos de microorganismos en concentraciones similares, por lo que se pasará directamente al uso de técnicas de aislamiento específicas para cada tipo de microorganismo agregado a la muestra, sin necesidad de utilizar medios de enriquecimiento.

Antes de iniciar el proceso de aislamiento y para efectos de cuantificar el microorganismo de interés, se realizarán diluciones decimales seriadas 1:10 de la muestra inoculada. Este método consiste en diluir la muestra utilizando sucesivamente el mismo factor de dilución (ej. 1:10 (10^{-1}), 1:100 (10^{-2}), 1:1000 (10^{-3}); etc.), lo que permite llegar a obtener una placa con un número de unidades formadoras de colonias (UFC) comprendido entre 30 y 300. Para conocer la concentración del microorganismo de interés por gramo o mililitro de muestra original, se multiplicará el número de UFC obtenido en la placa por el factor de dilución aplicado para esa placa específicamente.

En esta práctica, se utilizará la técnica de aislamiento (o siembra) por extensión, en el cual se agrega el inóculo (cantidad determinada de muestra o dilución que contiene el microorganismo de interés) directamente sobre la superficie de una placa de agar y se distribuye homogéneamente con un asa de vidrio (figura 11). También se utilizará el método de aislamiento por vaciado (o por vertido) que consiste en agregar el inóculo en una placa Petri estéril. Luego se agrega agar fundido a la placa, se mezcla con movimientos circulares, se deja solidificar, se incuba y se evalúa el resultado (figura 11).

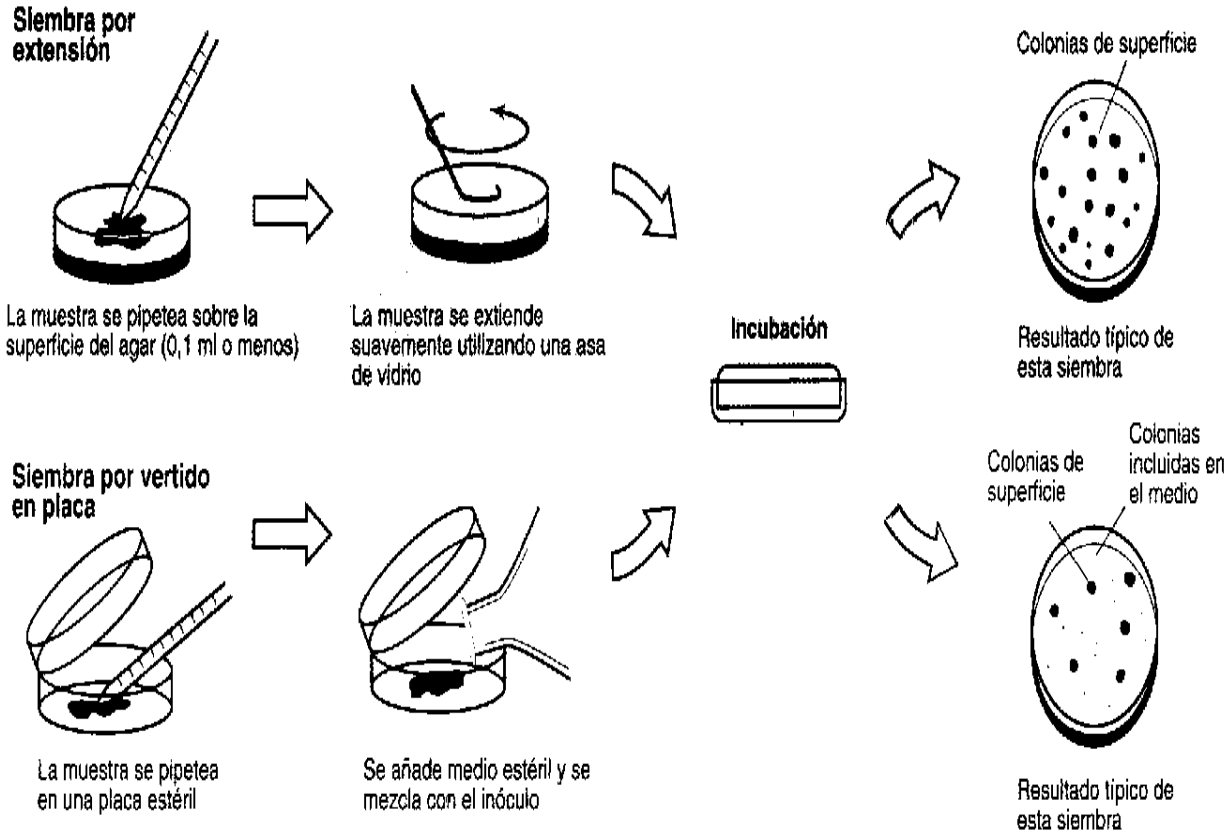


Figura 14. Aislamiento por extensión y por vaciado.

Por último, se realizará una demostración de recuento directo al microscopio. Este método es muy utilizado para evaluar la calidad de muestras líquidas con alto contenido microbiano (más de 20.000 células / mL). Normalmente se hace utilizando un hemocitómetro para células de levadura o una cámara de Petroff-Hauser para células bacterianas. El conteo directo al microscopio presenta la ventaja de que permite observar directamente la morfología de las células estudiadas, pero tiene como inconveniente el hecho de que no permite distinguir entre células vivas y células muertas.

Objetivo

Aplicar técnicas para el aislamiento y conteo de microorganismos.

Materiales

Natilla pasteurizada
Microorganismos crecidos para inocular la natilla pasteurizada

Espátulas para pesar
Erlenmeyer con 90 mL de agua peptonada al 0.1 %
Micropipetas de 1 mL
Puntas para micropipeta
Tubos con 9 mL de agua peptonada al 0.1 %
Placas de Petri estériles
Agar Bilis Rojo Violeta (BRV)
Agar Papa Dextrosa (APD)
Ácido tartárico o láctico
Agar Baird Paker suplementado con yema de huevo y telurito de potasio (BP)
Agar de Recuento Estándar (ARE)
Asa de Drigalski
Alcohol de 95
Cámara de Neubauer

Procedimiento

1. Inoculación de la natilla pasteurizada

Su profesor(a) seleccionará personas voluntarias que deseen inocular una misma muestra de natilla pasteurizada para todos los subgrupos de trabajo, agregando lo siguiente:

- Dos asadas de cultivos de coliformes.
- Dos asadas de cultivos de *Staphylococcus* spp.
- Dos cuadritos de cultivos de hongos filamentosos.

Al final la inoculación, se debe mezclar bien la muestra.

2. Preparación de diluciones seriadas 1:10

Rotule un Erlenmeyer conteniendo 90 mL de agua peptonada como "**Dilución 10^{-1}**".

Mezcle suavemente la muestra inoculada y pese 10 g. En condiciones asépticas, transfiéra los 10 g de muestra al Erlenmeyer que contiene los 90 mL de agua peptonada. Esta es la primera dilución **1:10** o **10^{-1}** de la muestra, ya que posee una parte de muestra y nueve partes del diluyente, para un total de 10 partes de dilución.

Rotule tres tubos con 9 mL de agua peptonada como: "**10^{-2}**", "**10^{-3}**" y "**10^{-4}**". Colóquelos en una gradilla de forma ordenada.

Agite muy bien la dilución 10^{-1}, de manera que quede completamente homogénea. Con ayuda de una micropipeta con punta estéril, transfiera 1 mL de la dilución 10^{-1} al tubo rotulado como "**10^{-2}**".

NOTA: Asegúrese de agitar muy bien cada dilución antes de preparar la siguiente, así como de cambiar punta de la micropipeta entre dilución y dilución. También asegúrese de mezclar bien, subiendo y bajando varias veces con la micropipeta el volumen de la dilución anterior, antes de dispensarlo totalmente en la nueva dilución. Esto es para que se transfiera la mayor parte de los microorganismos de la dilución. Es imposible que se transfiera la totalidad, ya que algunos van a quedar adheridos a las paredes del instrumento utilizado para dispensarlos. Por este motivo se debe cambiar la punta de la micropipeta entre dilución y dilución, ya que si se utiliza la misma para preparar todas las diluciones se estaría arrastrando un error cada vez más significativo.

Con otra punta de micropipeta estéril, agite muy bien la dilución 10^{-2} y transfiera 1 mL al tubo rotulado como "**10^{-3}**".

Con otra punta de micropipeta estéril, agite muy bien la dilución 10^{-3} y transfiera 1 mL al tubo rotulado como "**10^{-4}**".

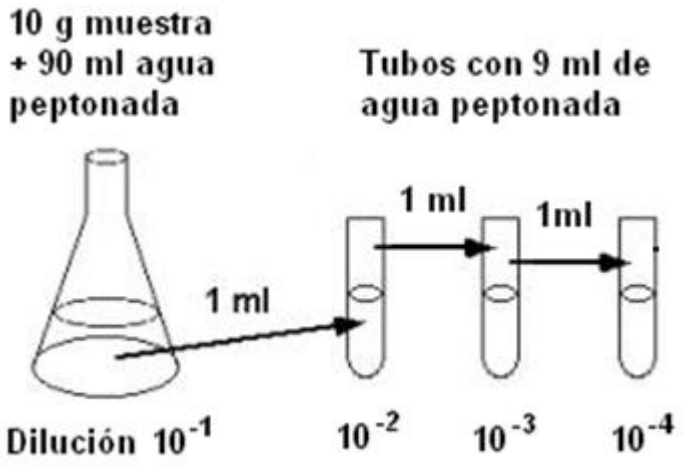


Figura 15. Preparación de diluciones seriadas 1:10 de la muestra de natilla pasteurizada e inoculada con una mezcla de microorganismos.

3. Aislamiento por vaciado

3a. Aislamiento de coliformes

Funda agar BRV y manténgalo en baño maría a 60 °C hasta su uso.

Rotule dos placas Petri estériles como "vaciado-coliformes 10^{-2}" y "vaciado-coliformes 10^{-3}". Escriba además las iniciales del subgrupo y la fecha.

Adicione 1 mL de la dilución correspondiente en el fondo de cada placa Petri estéril previamente rotulada.

Agregue aproximadamente 20 mL de medio de cultivo BRV en la placa de Petri y homogenice la muestra mediante movimientos circulares suaves. Asegúrese de que el agar esté a una temperatura tibia al tacto ("temperatura de cachete") al momento de dispensarlo, ya que temperaturas superiores pueden provocar la muerte de los microorganismos y subestimar la carga microbiana real del alimento.

Deje reposar la placa hasta que el medio solidifique. Posteriormente, agregue entre 5 y 10 mL adicionales de agar BRV fundido para formar una doble capa y deje solidificar nuevamente. Este procedimiento se realiza con el fin de evitar el fenómeno de swarming.

Incube la placa en posición invertida por 24-48 h a 37 °C y reporte, en UFC/g, el contenido de coliformes de la muestra origina, tomando en cuenta el factor de dilución de la placa correspondiente (figura 16). Anote el resultado en su cuaderno.

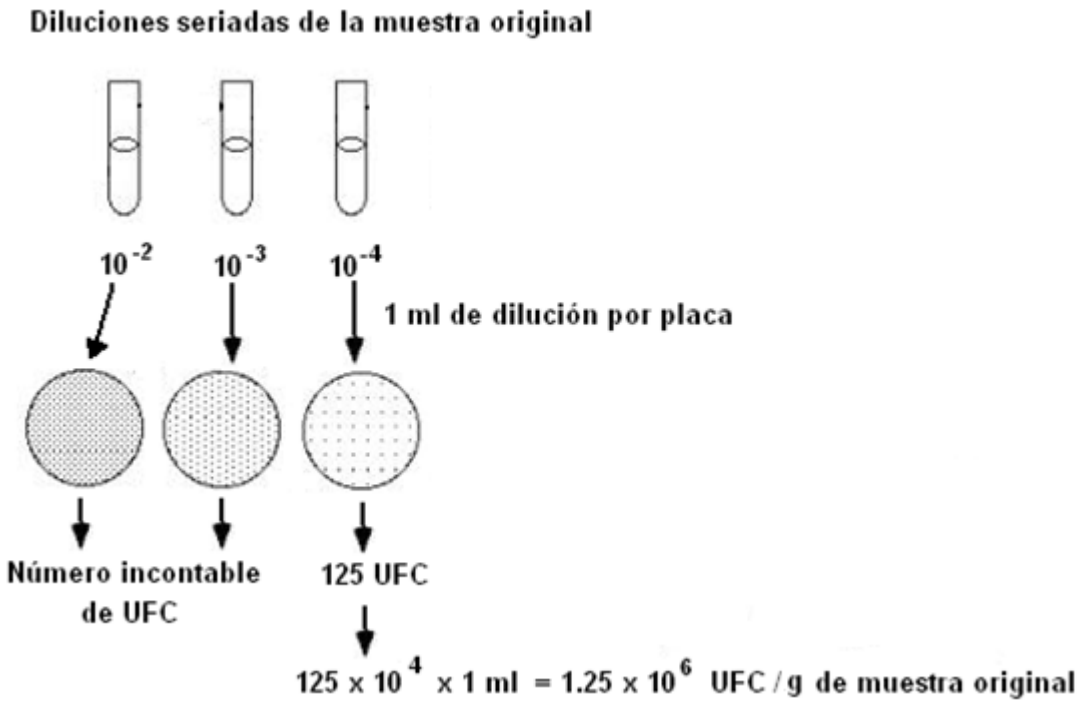


Figura 16. Conteo de UFC/g de la muestra original.

3b. Aislamiento de hongos

Funda APD y manténgalo en baño maría a 60 °C hasta su uso. Recuerde acidificarlo antes de usar, agregando 2 mL de ácido tartárico al 10% por cada 100 mL de medio.

Rotule dos placas Petri estériles como “vaciado-hongos 10^{-2}” y “vaciado-hongos 10^{-3}”. Escriba además las iniciales del subgrupo y la fecha.

Adicione 1 mL de la dilución correspondiente en el fondo de cada placa Petri estéril previamente rotulada.

En cada placa, coloque aproximadamente 25 mL de PDA previamente acidificado (con 2mL de ácido tartárico al 10% por cada 100 mL de medio) y homogenice con movimientos circulares suaves.

Deje en reposo hasta que el medio solidifique.

Dado que se está realizando un aislamiento de hongos por vaciado: 1-se pueden incubar las placas a temperatura ambiente por una semana **en posición invertida** y 2-transcurrido este tiempo se pueden contar UFCs.

4. Siembra por extensión

4a. Aislamiento de *Staphylococcus* spp.

Flamee un asa de Drigalski con alcohol de 95 y espere a que enfríe. Mientras enfría, rotule dos placas de agar BP como “extensión-Staph 10^{-1}” y “extensión-Staph 10^{-2}”, además de la fecha y las iniciales del grupo.

Inocule cada placa con 0.1 mL de la dilución correspondiente y extienda el inóculo con espátula de Drigalski. Deje reposar diez minutos para que el agar absorba la muestra.

Incube la placa invertida por 24-48 h a 37 °C.

Transcurrido el período de incubación observe y cuente las colonias, reporte en su cuaderno el resultado de UFC/g de muestra original. Recuerde que, en el caso de las siembras por extensión, se debe considerar un factor adicional de 10 con respecto a lo indicado en la figura 16, ya que se inocula solo 0.1 mL en lugar de 1 mL, como en el caso de las siembras por vaciado.

4b. Recuento total

Flamee un asa de Drigalski con alcohol de 95 y espere a que enfríe. Mientras enfría, rotule dos placas de ARE como “extensión-total 10^{-3}” y “extensión-total 10^{-4}”, además de la fecha y las iniciales del grupo.

Inocule cada placa con 0.1 mL de la dilución correspondiente y extienda el inóculo con espátula de Drigalski. Deje reposar diez minutos para que el agar absorba la muestra.

Incube la placa invertida por 24-48 h a 37 °C.

Transcurrido el período de incubación observe y cuente las colonias, reporte en su cuaderno el resultado de UFC/g de muestra original. Recuerde que, en el caso de las siembras por extensión, se debe considerar un factor adicional de 10 con respecto a lo indicado en la figura 16, ya que se inocula solo 0.1 mL en lugar de 1 mL, como en el caso de las siembras por vaciado.

5. Recuento directo de células

El instructor dará la demostración de una lectura por conteo directo al microscopio de acuerdo con la figura 14.

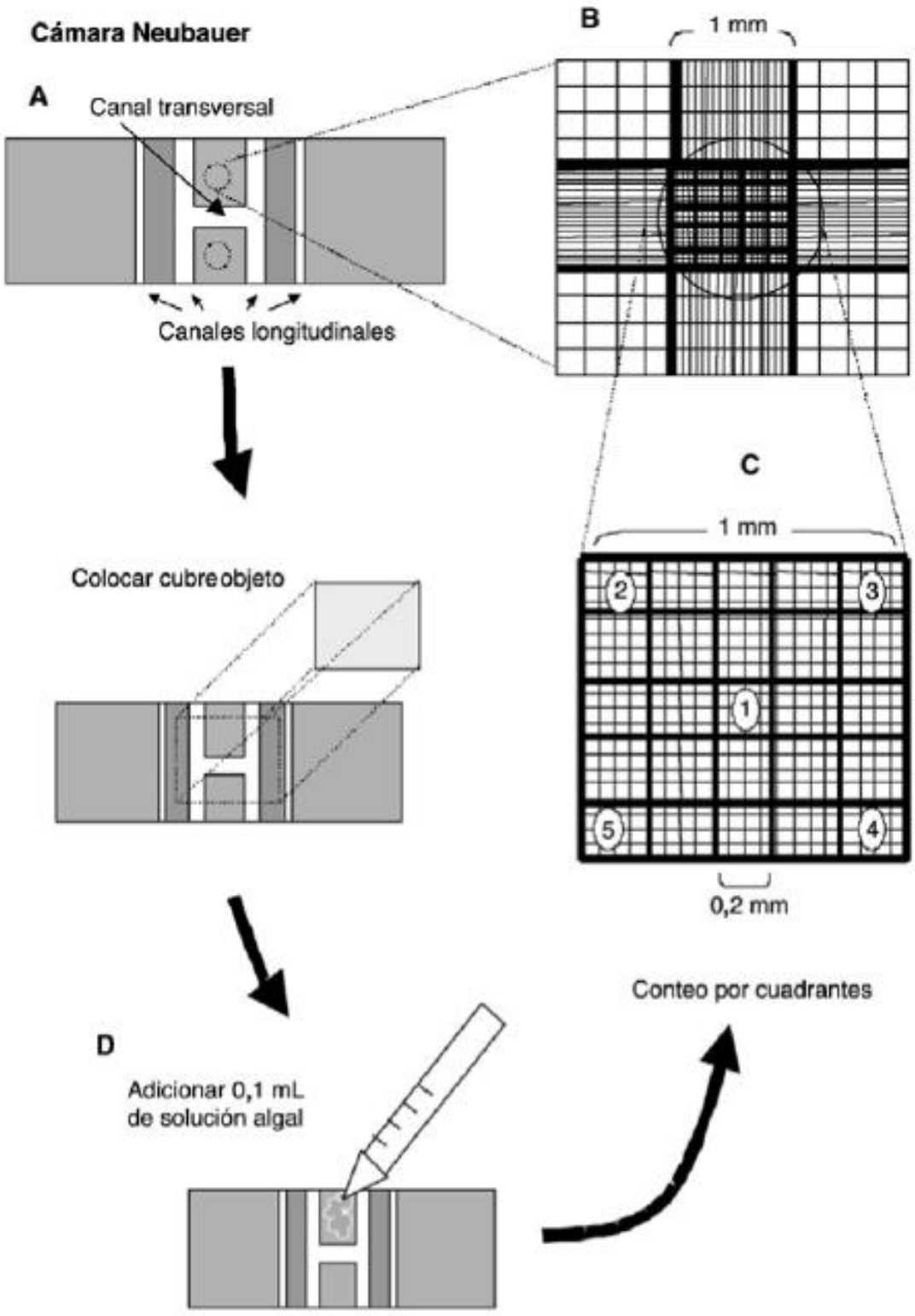


Figura 17. Recuento directo en hemocitómetro.

Cuestionario

1. ¿Por qué las diluciones decimales se realizan en agua peptonada? ¿Se podría usar agua destilada estéril para realizar diluciones seriadas?

2. Suponga que usted obtuvo los siguientes recuentos a partir de una muestra de natilla:

Dilución	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
U.F.C/mL	Incontable	Incontable	1250	280	13

a) ¿Cuántas bacterias por mL hay en el tubo de la dilución 10^{-3} ?.

b) ¿Cuántas bacterias en total hay en el tubo correspondiente a la dilución de 10^{-5} ?.

c) ¿ Cómo reportaría usted el resultado de ésta muestra?, recuerde las cifras significativas.

3. Suponga que usted estaba realizando un recuento de levaduras en el laboratorio, pero lo hizo tan rápido que cometió una serie de errores:

    a- En lugar de 10 gramos pesó 1 gramo.

    b- Luego realizó 5 diluciones decimales de la muestra y en el momento de pasarlas a las placas de Petri omitió los tubos correspondientes a la primera y la tercera dilución.

    c- En los tres placas de Petri restantes no contó todas las colonias que había y contó solo la mitad de cada plato; estos recuentos fueron de : 481, 32 y 10 colonias respectivamente.

    d- Remediando todos estos errores ¿Cuánto es el conteo que debe usted reportar de levaduras en la muestra?

Referencias

Arias, M.L, Antillón, F., Chaves, C. & Villalobos, L. (2008). *Microbiología de aguas y alimentos. Principios y prácticas de laboratorio*. San José, Editorial Univerisidad de Costa Rica.

Gamazo, C., López-Goñi, I., Díaz, R. (2005). *Manual práctico de Microbiología*. 3era Edición. España, Editorial Elsevier.

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P.V. & Clark, P.C. (2009). *Brock: Biología de los Microorganismos*. 12 Edición. Madrid, Editorial Prentice Hall.

Montero, V. (2008). *Manual de Prácticas de Laboratorio Microbiología Aplicada*. Instituto Tecnológico de Costa Rica.

Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A. (1996). *Microbiology*. Third Edition. United States of America, Wm. C . Brown Publishers.

Public Health England. *Preparation of samples and dilutions, plating and sub-culture*, 2014. London: England. Microbiology Services Food Water and Environmental Microbiology Standard Method. Recuperado de: http://www.hpa.org.uk/ProductsServices/MicrobiologyPathology/SpecialistMicrobiologyServices/FoodWaterEnvironmentalMicrobiologyServices/NationalReferenceLaboratoryForFoodMicrobiology/

Rodríguez, E., Gamboa, M.M., Hernández, F. & García, J.D. (2005). *Bacteriología general: Principios y prácticas de laboratorio*. San José, Editorial Universidad de Costa Rica.

Rojas, N., Chaves, E., García, F. (2006). *Bacteriología Diagnóstica*. Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, San José: Costa Rica. Recuperado de http://www.infectologiapediatrica.com/attachments/bacteriologia_diagnostica.pdf

Burdass, D., Grainger, J. & Hurst, J. *Basic Practical Microbiology. A manual*, 2006. Malborough House: England. Society for General Microbiology. Recuperado de: http://www.microbiologyonline.org.uk/media/transfer/doc/sgm_basic_practical_microbiology_2.pdf

PRÁCTICA 10. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE AGUAS

Introducción

El análisis microbiológico de aguas ha adquirido importancia en los últimos años, debido al incremento en las infecciones emergentes adquiridas por consumo de aguas contaminadas. Esto es de especial relevancia en niños pequeños y personas de avanzada edad, ya que son más susceptibles.

Una de las principales fuentes de contaminación del agua son las descargas de materia fecal, especialmente de personas enfermas o portadoras de infecciones gastrointestinales.

El grupo de las bacterias coliformes se emplea como indicador universal de contaminación orgánica y fecal y de calidad sanitaria en agua, alimentos, productos farmacéuticos e industriales. Dentro de este grupo, la bacteria *E. coli* se utiliza como indicador específico de contaminación fecal.

El análisis microbiológico de aguas se puede llevar a cabo mediante la técnica de N.M.P. (Número Más Probable) que consiste en tomar volúmenes de 10, 1, y 0.1 mL en series de 3 o de 5 tubos, respectivamente con volúmenes de 10, 5 y 5 mL de medio de cultivo.

Para esta técnica puede utilizarse el medio LMX® de la casa comercial Merck. Este medio contiene el sustrato cromógeno 5-bromo-4 cloro -3-indolil-ß -D- galactopiranósido (X-Gal), el cual es escindido por la enzima β-D-galactosidasa de los coliformes, de modo que produce un viraje de color del caldo de cultivo a verde azulado. Además el 1-isopropil - B -D - 1 - tiogalactopiranósido (IPTG) del medio actúa como sustancia intensificadora en la síntesis enzimática y aumenta el contenido de la actividad de β-D-galactosidasa. La coloración verde azulada indica entonces la presencia de bacterias coliformes totales.

El caldo LMX® también contiene lauril sulfato, el cual inhibe el crecimiento de bacterias Gram positivas, aumentando la selectividad de la técnica.

Por otro lado, la composición del LMX® incluye el sustrato fluorogénico 4 - metillumbeliferil - ß - D - Glucurónido (MUG). Al margen de ciertas especies de *Salmonella* y *Shigella*, la bacteria *Escherichia coli* es la única especie perteneciente al grupo de las Enterobacterias que posee la enzima ß - D - Glucuronidasa. Esta enzima es capaz de escindir el MUG, formando 4 - metillumbeliferona. Esta sustancia se caracteriza por ser fluorescente al iluminarse con luz U.V, lo que permite su detección fácilmente. Este hecho es, al mismo tiempo, un indicador de la presencia de *E.coli*.

El sustrato fluorógeno (MUG) y su comprobación con luz U.V de onda larga son altamente específicos para *E. coli*.

Sin embargo, para un resultado más confiable, se puede realizar la prueba de indol, la cual permite determinar si la bacteria es capaz de desdoblar el triptófano. La prueba consiste en agregar unas gotas del reactivo de Kovacs (p-dimetilamino-benzaldehído) al cultivo de interés. Si la prueba es positiva, se producirá un anillo de color fucsia en la superficie del caldo.

Objetivo

Aplicar métodos para el análisis microbiológico de aguas.

Materiales

Bolsas para tomar muestras de agua o tubo Falcon de 50 mL estéril
Pipetas de 10 mL estériles
Micropipetas
Puntas de micropipeta estériles
Tubos de ensayo con 10 mL de LMX® de Merck
Tubos de ensayo con 5 mL de LMX® de Merck
Cultivos crecidos de diferentes Enterobacterias, incluyendo *E. coli*.

Procedimiento

Para esta práctica, se requiere que los subgrupos de trabajo se organicen de la siguiente forma:

- Subgrupo 1: Tome una muestra de agua potable del grifo (control negativo).
- Subgrupo 2: Agregue una asada de diferentes cultivos crecidos de Enterobacterias que se le proporcionen, siendo una de ellas *E. coli* (control positivo).
- Subgrupo 3: Tome una muestra de agua del lago del TEC o de la planta de tratamiento de aguas residuales, teniendo los cuidados respectivos.
- Subgrupo 4: Prepare una dilución 1:10 de la muestra de agua que tomó el subgrupo 3, utilizando agua potable del grifo como solvente.

Posteriormente, transfiera volúmenes de 10, 1, y 0.1 mL de la muestra que le tocó en series de 3 tubos conteniendo volúmenes de 10, 5 y 5 mL de caldo LMX® respectivamente.

Incube 24 h a 37° C y anote la cantidad de tubos que presentan coloración verde azulada.

Exponga los tubos que cambiaron de color a luz UV y determine cuantos tubos emiten fluorescencia.

A los tubos que emitieron fluorescencia bajo luz UV, agrégueles unas gotas de reactivo de Kovacs y determine cuantos tubos son positivos para la prueba de indol.

Utilice la tabla de N.M.P. (tabla de probabilidad estadística) que se presenta a continuación para reportar sus resultados de coliformes totales y *E. coli* presentes por cada 100 mL de muestra.

Cuadro 3. Tabla de NMP.

NUMBER OF TUBES GIVING POSITIVE REACTION OUT OF			MPN Index	95 PERCENT CONFIDENCE LIMITS	
3 of 10 ml each	3 of 1 ml each	3 of 0.1 ml each	per 100 ml	Lower	Upper
0	0	1	3	<0.5	9
0	1	0	3	<0.5	13
1	0	0	4	<0.5	20
1	0	1	7	1	21
1	1	0	7	1	23
1	1	1	11	3	36
1	2	0	11	3	36
2	0	0	9	1	36
2	0	1	14	3	37
2	1	0	15	3	44
2	1	1	20	7	89
2	2	0	21	4	47
2	2	1	28	10	150
3	0	0	23	4	120
3	0	1	39	7	130
3	0	2	64	15	380
3	1	0	43	7	210
3	1	1	75	14	230
3	1	2	120	30	380
3	2	0	93	15	380
3	2	1	150	30	440
3	2	2	210	33	470
3	3	0	240	36	1,300
3	3	1	460	71	2,400
3	3	2	1,100	150	4,800

Fuente: APHA, 1998.

Cuestionario

1. Cite tres características que comparten entre sí los microorganismos denominados coliformes.

2. Explique la importancia práctica industrial y ambiental de los coliformes.

3. Investigue el fundamento de la prueba de indol.

4. ¿En qué consiste la técnica de filtración por membrana? ¿Qué ventajas y desventajas presenta en comparación con la técnica de NMP?

Referencias

American Public Health Association (APHA). (1998). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 18va edición. New York, The American Public Health Association, Inc.

Arias, M.L, Antillón, F., Chaves, C. & Villalobos, L. (2008). *Microbiología de aguas y alimentos. Principios y prácticas de laboratorio*. San José, Editorial Univerisidad de Costa Rica.

Montero, V. (2008). *Manual de Prácticas de Laboratorio Microbiología Aplicada*. Instituto Tecnológico de Costa Rica.

PRÁCTICA 11. CONTROL DE MICROORGANISMOS POR AGENTES FISICOS Y QUIMICOS

Introducción

En la industria alimentaria, farmacéutica y médica, entre otras, es necesario controlar las poblaciones microbianas mediante agentes físicos y químicos selectivos, debido a que los microorganismos causan deterioro en alimentos y medicamentos. Además, también pueden contaminar dispositivos médicos, de modo que cuando estos entran en contacto con el cuerpo humano, pueden causar infecciones.

Existen regulaciones internacionales que especifican acciones y medidas a tomar para combatir microorganismos no deseados en materia prima, plantas industriales y producto terminado.

Esta práctica el estudiante se familiarizará con los efectos, aplicaciones e implicaciones, sobre una población específica de microorganismos, de agentes físicos, entre ellos la luz ultravioleta y los metales pesados, así como agentes químicos como los desinfectantes.

La luz ultravioleta es absorbida por los ácidos nucleicos, en los cuales causa alteraciones perjudiciales para su integridad, conocidas como dímeros de timina.

Los iones de algunos metales pesados en pequeñas cantidades ejercen acción oligodinámica sobre bacterias y otros microorganismos (oligos= pequeño, poco y dynamis= fuerza, poder). Este tipo de metales se han usado con diferentes aplicaciones. Se sugiere que ellos actúan sobre los microorganismos fijándose a las proteínas celulares, principalmente a los grupos sulfhidrilo, lo que desnaturaliza las proteínas.

Uno de los desinfectantes más usados en el laboratorio es el alcohol de 70°. Se ha sugerido que su mecanismo de acción antimicrobiana involucra la desnaturalización de proteínas. Además disuelve líquidos.

Objetivo

Emplear agentes físicos y químicos para el control del crecimiento microbiano.

Materiales

Cultivo crecido de *E. coli*
Tubo de ensayo con 5 mL de Solusión Salina Estéril (SSE)
Tubos Eppendorf con 900 µl de SSE
Vortex

Estándar de McFarland 0.5
Tarjeta Wickerham
Alcohol de 95
Asa de Drigalski
Micropipetas de 1 mL
Puntas de micropipeta de 1 mL
Placas con ARE
Placas Petri estériles
ARE fundido
Trozo de cobre metálico
Plantilla de cartón para muestrear un área de 5 cm^2
Masking tape
Alcohol de 70° u otro desinfectante de interés
Tubos de ensayo con 2 mL de caldo Tripticasa y soya (CTS)
Torundas estériles
Tubos de ensayo con 2 mL de Caldo Letheen
Tubos con hisopos
Tubo de ensayo con 20 mL de ARE

Procedimiento

1. Control microbiano por agentes físicos

1a. Luz Ultravioleta

En un tubo con 5 mL de SSE, prepare una suspensión bacteriana de *E. coli* con una turbidez equivalente a un Estándar de McFarland 0.5. Utilice la tarjeta Wickerham para comparar la turbidez.

Rotule cinco tubos Eppendorf como "Dilución 10^{-1}", "Dilución 10^{-2}", "Dilución 10^{-3}", "Dilución 10^{-4}" y "Dilución 10^{-5}".

Agite en el vortex la suspensión bacteriana de *E. coli*, debidamente tapada para que no se derrame. Inmediatamente, flamee la boca del tubo y extraiga 100 ul de la suspensión bacteriana con ayuda de una micropipeta. Transfiera ese volumen a un tubo eppendorf con 900 ul de SSE, previamente rotulado como "Dilución 10^{-1}", asegurándose de subir y bajar el volumen varias veces antes de dispensar por completo en el tubo Eppendorf. Continúe diluyendo de forma seriada 1:10, hasta llegar a obtener una dilución 10^{-5} de la suspensión bacteriana de *E. coli*.

Flamee un asa de Drigalski con alcohol de 95° y deje enfriar.

Agite en el vortex la dilución 10^{-5} de la suspensión bacteriana de *E. coli* e inocule 0.1 mL por placa de ARE, en un total de tres placas; distribuyendo el inóculo por toda la placa con la ayuda de un asa de Drigalski.

Deje que el inóculo penetre en el agar.

Rotule una de las tres placas como “Control UV”, otra como “UV” y otra como “UV+Luz visible”. Agregue a la rotulación, las iniciales del subgrupo y la fecha.

Exponga las placas rotuladas como “UV” y “UV+Luz visible” a 15 minutos de luz ultravioleta directa (con la tapa abierta).

Transcurrido este tiempo, envuelva inmediatamente la placa “UV” con papel aluminio, para protegerla de la luz visible y ponga la placa “UV+Luz visible” en contacto con luz visible por 15 minutos.

Incube las tres placas en posición invertida por 24-48 h a 37 °C.

Transcurrido este tiempo proceda a revisar las placas. Reporte los resultados en su cuaderno.

2. Control microbiano por agentes químicos

2a. Metales pesados

Rotule dos placas Peri estériles, una como “cobre” y la otra como “control de crecimiento-cobre”. Escriba también las iniciales del subgrupo y la fecha.

En el fondo de ambas placas, inocule separadamente 1 mL de la suspensión bacteriana de *E. coli* con turbidez equivalente a un Estándar de McFarland que preparó para el experimento de luz UV. No olvide agitar el tubo en el vortex antes de extraer el inóculo.

Adicione ARE fundido en ambas placas y mezcle el agar con el inóculo, mediante movimientos circulares suaves.

Antes de que solidifique la placa rotulada como “cobre”, coloque un trozo de cobre utilizando pinzas.

NOTA: Asegúrese de tener todo listo cuando vaya a realizar este paso, ya que el ARE inoculado puede llegar a solidificar, antes de haya colocado el trozo de cobre. Si esto sucede, debe repetir esta parte del ensayo.

Deje solidificar completamente el medio de cultivo con el inóculo en ambas placas.

Incube por 24-48 h a 37 °C.

Transcurrido el tiempo de incubación anote los resultados en su cuaderno.

2b. Desinfectantes

Adhiera con masking tape a la mesa de trabajo una plantilla de cartón que deje al descubierto una superficie de 5 x 5 cm.

Sumerja una torunda estéril en caldo CTS y tome una muestra de la superficie de la mesa delimitada por la plantilla.

Proceda a rayar una placa de ARE con el hisopo. Rotule como "Control desinfectante" e incube en posición invertida por 24-48 h a 37 °C.

Luego, desinfecte con alcohol de 70 otra área de la mesa cercana a la primera área muestreada y adhiera la plantilla de cartón. Proceda a muestrear los microorganismos que sobrevivieron a la desinfección, mediante el uso de otra torunda estéril humedecida en CTS. Rotule como "Desinfectante" e incube en posición invertida por 24-48 h a 37 °C.

Repita el paso anterior, pero esta vez usando caldo Letheen en vez de CTS para humedecer la torunda estéril. Rotule como "Desinfectante + Letheen" e incube en posición invertida por 24-48 h a 37 °C.

Transcurrido el tiempo de incubación, revise las placas y anote los resultados en su cuaderno.

Cuestionario

1. Mencione 5 situaciones diferentes en las que es importante controlar el crecimiento o proliferación de los microorganismos.

2. Mencione el daño celular que provocan los siguientes métodos de desinfección en las bacterias: Alcohol de 70°, rayos UV, Amonios cuaternarios, metales pesados.

3. Describa la función del Caldo Letheen.

Referencias

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P.V. & Clark, P.C. (2009). *Brock: Biología de los Microorganismos*. 12 Edición. Madrid, Editoril Prentice Hall.

Montero, V. (2008). *Manual de Prácticas de Laboratorio Microbiología Aplicada*. Instituto Tecnológico de Costa Rica.

Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A. (1996). Microbiology. Third Edition. United States of America, Wm. C . Brown Publishers.

PRÁCTICA 12. PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A AGENTES ANTIMICROBIANOS

Introducción

Los hongos y bacterias difieren en su grado de susceptibilidad frente a un determinado agente antimicrobiano. La adquisición de resistencia se debe principalmente a un abuso en la utilización de estos agentes, lo cual propicia la selección de microorganismos cada vez más tolerantes.

Existen diferentes métodos para la determinación *in vitro* del nivel de resistencia de los microorganismos.

Las pruebas de susceptibilidad a antimicóticos para hongos de importancia clínica han cobrado gran relevancia en los últimos años debido al incremento de infecciones fúngicas en pacientes inmunosupresos. Sin embargo, estas pruebas presentan dificultades de estandarización.

En el caso de los hongos fitopatógenos, las pruebas son más sencillas ya que consisten en cultivar el microorganismo de interés en presencia del fungicida que se desea probar. Posteriormente, se trasladan los resultados al campo.

Por otra parte, en bacteriología clínica, existen varias formas de realizar las pruebas de sensibilidad a antibióticos (PSA). Entre ellas el método denominado "Difusión con discos en agar" o prueba de "Kirby Bauer", el cual se caracteriza por inocular una cantidad estandarizada de la bacteria a evaluar en un medio denominado Müeller-Hinton. Posteriormente, se colocan diferentes discos de papel filtro impregnados con concentraciones conocidas de los antibióticos que se desea probar.

El medio Müeller-Hinton favorece la difusión de los antibióticos a través del agar por medio de zonas de difusión radial (figura 18). De esta manera la concentración del antibiótico es mayor en las zonas más cercanas al disco y menor en las más alejadas.

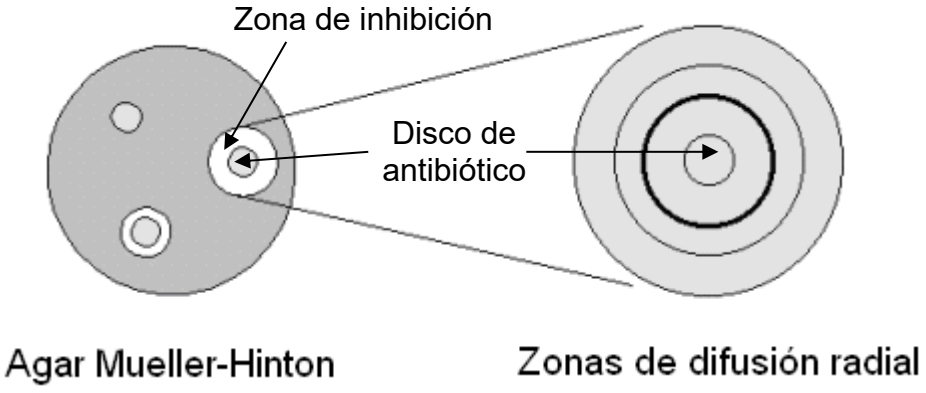


Figura 18. Zonas de inhibición del crecimiento bacteriano y zonas de difusión radial alrededor del disco de antibiótico.

El fundamento de la prueba radica en que el crecimiento bacteriano se detiene cuando la concentración del antibiótico es igual a la concentración mínima inhibitoria (MIC) específica de la bacteria que se está evaluando. Esto genera una zona de inhibición alrededor del disco (figura 19), cuyo tamaño es inversamente proporcional a la MIC.

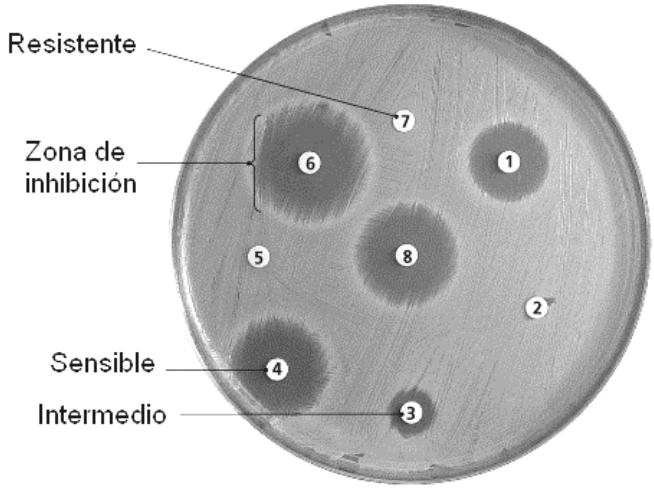


Figura 19. Interpretación de los resultados.

Para la interpretación de los resultados se debe medir el diámetro de la zona de inhibición y mediante el uso de tablas de referencia para cada bacteria y para cada antibiótico, establecidas por organismos internacionales como el *Clinical Laboratory Standars Institute* (CLSI), se puede extrapolar el grado de sensibilidad.

Objetivo

Aplicar técnicas para analizar la susceptibilidad microbiana a antibióticos y fungicidas

Materiales

Hojas de bisturí o tijeras
Placas de Agar Papa Dextrosa (APD)
Placas Petri estériles
PDA fundido
Ácido tartárico al 10%
Micropipetas para 1 mL

Puntas de micropipeta
Diluciones de fungicidas en frasco gotero
Cultivo crecido de *E. coli* en ARE
Torundas estériles
Tubo con 5 mL Solución Salina Estéril (SSE)
Estándar de McFarland 0.5
Tarjeta Wickerham
Agar Müeller Hinton (MH)
Discos de antibióticos

Procedimiento

1. Pruebas de sensibilidad para hongos

a. Aislamiento de hogos a partir de una muestra vegetal

Colecte una hoja de una planta con sintomatología de infección por hongos, por ejemplo, áreas necróticas rodeadas de clorosis (figura 20) o manchas blancuzcas.

Figura 20. Ejemplo de manchas características de una hoja infectada por hongos. Fuente: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/472513/Ficha_t_cnica_Mycosphaerella_musicola.pdf

Lave la hoja con agua y jabón. Desinféctela con alcohol y deje secar.

Corte, con un bisturí o con tijeras desinfectadas con alcohol, la parte afectada por hongos e inocúlela en APD utilizando pinzas. Rotule e incube a temperatura ambiente por una semana.

b. Prueba de sensibilidad

Prepare y autoclave dos matraces de medio Agar Papa Dextrosa. Antes de chorrear, proceda a acidificar el medio con ácido tartárico al 10% (se agregan 2 mL de ácido por cada 100 de

medio). A uno de los matraces, agréguele 1 mL de la solución de fungicida que se le proporcione, y al otro agréguele 0.1 mL, para tener medio con fungicida a dos concentraciones distintas, una más alta y otra más diluida. Mezcle con movimientos circulares suaves, dispense en placas Petri y deje solidificar.

Inocule el hongo aislado en una placa de cada concentración de fungicida e incube 1 semana a temperatura ambiente.

Transcurrido este tiempo revise las placas y anote los resultados en su bitácora de laboratorio.

2. Pruebas de sensibilidad para bacterias

a. Estandarización del inóculo

Con una torunda estéril y condiciones asépticas, tome una colonia del cultivo bacteriano a analizar.

Resuspenda el crecimiento en un tubo con solución salina estéril hasta formar una suspensión bacteriana homogénea con una turbidez equivalente a un estándar de Mc Farland de 0.5.

b. Inoculación

Sumerja una nueva torunda estéril en la suspensión bacteriana y deje que se impregne de la misma. Escurra el exceso de suspensión presionando la torunda ligeramente contra la pared interna del tubo.

Utilice la torunda para rayar de manera muy tupida y en una sola dirección, una placa de agar Müeller Hinton. Luego, tape la placa y rótela en un ángulo de 60 ° y vuelva a rayar la placa con la misma torunda y de la misma manera. Repita este paso una vez más (figura 21).

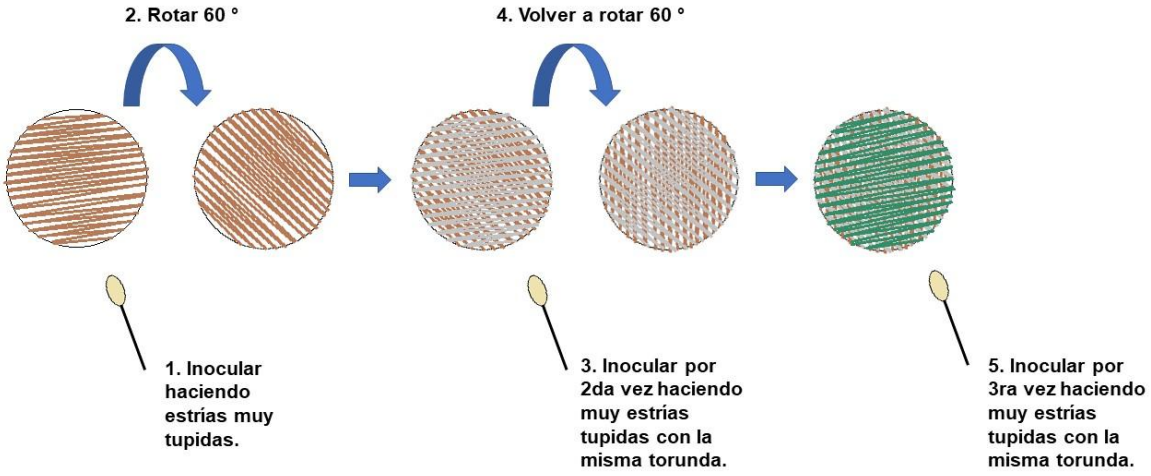
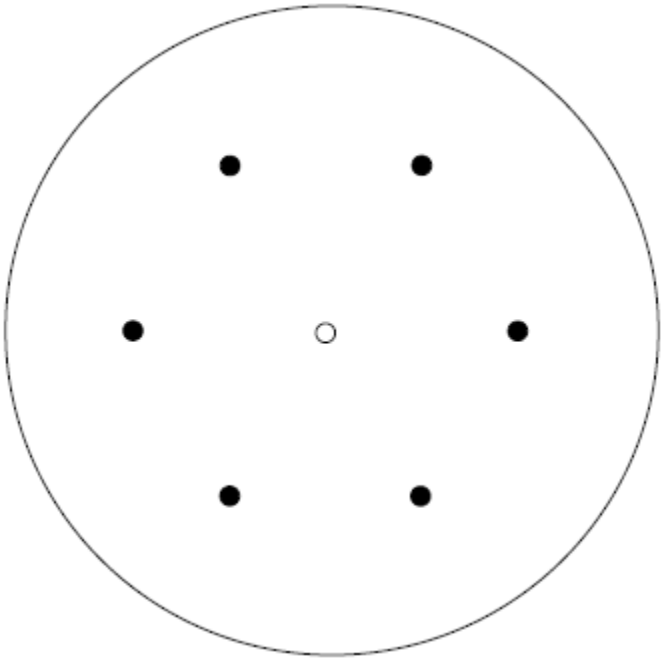


Figura 21. Esquema de cómo inocular el agar Müeller Hinton para una PSA de bacterias. Las estrías deben ser muy estrechas y tupidas y además se hace tres veces, ya que el objetivo es que las bacterias crezcan formando una capa muy uniforme sobre toda la superficie del agar.

Deje secar la placa y colóquela debajo de una plantilla que le sirva de guía para colocar los antibióticos como la que se muestra a continuación.



NOTA: La distancia entre los discos debe ser mayor a 24 mm para evitar que se traslapen los halos de inhibición. Además, tampoco es recomendable evaluar más de seis discos simultáneamente en una misma placa.

Figura 22. Plantilla para la colocación de los discos de antibióticos.

c. Colocación de los discos de antibióticos

Flamee unas pinzas y tome un disco de antibiótico, colóquelo sobre la superficie del agar guiándose con la plantilla.

NOTA: ***NO*** cambie los discos de lugar una vez colocados aunque no hayan quedado exactamente en el lugar indicado, ya que esto puede afectar el inóculo y la posterior lectura del resultado.

Repita el paso anterior con todos los antibióticos a evaluar.

Presione suavemente con la pinza todos los discos de antibióticos para evitar que se desprendan de la superficie del agar.

Rotule adecuadamente e incube la placa en posición invertida por 24 h a 37 °C.

d. Lectura de los resultados

Transcurrido este tiempo mida para cada antibiótico el diámetro de las zonas de inhibición en milímetros. Anote los resultados en su cuaderno y consulte en la siguiente a clase a su profesor sobre la interpretación de los resultados.

Cuestionario

1. Explique los resultados que usted obtuvo en la prueba de sensibilidad para hongos, ¿Qué resultados esperaba obtener y por qué?

2. Investigue tres factores que afectan las pruebas de sensibilidad antifúngicas.

3. ¿Qué cuidados se deben tomar en cuenta en el montaje correcto de una prueba de sensibilidad para bacterias?

Referencias

Mahon C. R., Manuselis G. (2000). *Textbook of Diagnostic Microbiology*. Second Edition. United States of America, W.B. Saunders Company.

Mendez, J., Herrera, M.L. (2001). Métodos de susceptibilidad antifúngica: revisión metodológica. *Rev. méd. Hosp. Nac. Niños (Costa Rica)*, 36, (1-2), 37-44.

Montero, V. (2008). *Manual de Prácticas de Laboratorio Microbiología Aplicada*. Instituto Tecnológico de Costa Rica.

Rodríguez, E., Gamboa, M.M., Hernández, F. & García, J.D. (2005). *Bacteriología general: Principios y prácticas de laboratorio*. San José, Editorial Universidad de Costa Rica.

Rojas, N., Chaves, E., García, F. (2006). *Bacteriología Diagnóstica*. Recuperado de http://www.infectologiapediatrica.com/attachments/bacteriologia_diagnostica.pdf

PRÁCTICA 13. PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS DE INTERÉS INDUSTRIAL

Introducción

El uso de microorganismos en procesos biotecnológicos tiene una larga historia. Durante milenios, el ser humano elaboró productos alimenticios por medio de fermentaciones espontáneas con microorganismos naturalmente presentes en materias primas, sin realmente tener conciencia de lo que estaba ocurriendo a nivel bioquímico. Por ello, la calidad y productividad de estos procesos era inconsistente. Sin embargo, el desarrollo científico-tecnológico permitió la búsqueda, aislamiento, selección y mejoramiento de microorganismos, así como el diseño de procesos biotecnológicos de interés industrial más eficientes, lo cual generó gran impacto económico.

Esta práctica se enfocará en la fabricación de queso fresco. Se cree que los nómadas fueron los primeros en hacer queso. Ellos utilizaban los estómagos de los carneros y las ovejas para hacer bolsas, en las cuales almacenaban agua y leche. En una de esas bolsas que probablemente no se había terminado de procesar y contenía aún restos de enzimas digestivas, se depositó leche, que, durante algún viaje largo, se pudo haber fermentado por el calor y la acción microbiana, produciendo queso.

La fabricación de queso, independientemente de su tipo, tiene un fundamento común que involucra una serie de cambios bioquímicos y microbiológicos en la materia prima que es la leche. La leche está constituida por principalmente por agua (85%) y lactosa (5%), y en menor medida por grasa, proteínas y sales. El 80% de las proteínas de la leche son caseínas, que a su vez se componen de 4 especies electroforéticas designadas como αs1-, αs2-, ß- y κ-caseína. El primer cambio consiste en la hidrólisis de la κ-caseína, mediante la adición de una proteasa digestiva conocida como quimosina o renina. Como resultado se obtiene paracaseinato, el cual precipita junto con el calcio, formando coágulos de paracaseinato de calcio. La compresión de estos coágulos forma el queso fresco o inmaduro, que incorpora también otros componentes de la leche como grasa y lactosa. El queso fresco puede consumirse inmediatamente después de su fabricación, aunque por lo general se somete a un proceso de maduración con microorganismos fermentadores para proporcionarle diferentes sabores, olores y textura al queso.

Las medidas higiénicas en la elaboración del queso son muy importantes, así como, la calidad microbiológica de la leche empleada, pues al ser un producto alimenticio rico, podría servir de medio de cultivo para muchos microorganismos. La intoxicación alimentaria con queso es relativamente frecuente, como consecuencia de la contaminación de este con cepas de *S. aureus* enterotoxigénicas. Uno de los mecanismos empleados por los productores para evitar la descomposición del queso es adicionar una cantidad alta de sal, lo cual limita el crecimiento de la mayoría de las bacterias, pero no de *Staphylococcus*.

Se estima que el mercado global del queso supera los 74 000 millones de dólares estadounidenses y que continuará creciendo, ya que la popularidad, así como el valor agregado del producto, ha aumentado con la diversificación de sus propiedades organolépticas, con la incorporación de probióticos y prebióticos, y con el auge de procesos artesanales de fabricación.

Objetivo

Comprender un proceso biotecnológico de interés industrial y evitar que el producto final se contamine.

Materiales

1 litro de leche entera sin pasteurizar
Olla de cocina o recipiente grande y limpio para calentar la leche
Baño María a 72 °C y a 37°C
Micropipeta de 1 mL muy limpia y desinfectada
Puntas para micropipeta de 1 mL ésteriles
Cloruro de calcio líquido
Cuajo Chymax (enzima quimosina)
Cuchara de cocina limpia
Cuchillo de cocina limpio
Colador de cocina limpio
Sal al gusto
Molde para prensar el queso

Procedimiento

Primeramente se debe pasteurizar la leche, calentándola en baño maría hasta que alcance 72 °C, por 30 segundos.

Luego se deja enfriar hasta que esté a una temperatura de 37°C.

Hasta ese momento se adiciona 1mL de cloruro de calcio por litro de leche y se mezcla suavemente con la cuchara.

Luego, se agregan 600 ul de cuajo Chymax por litro de leche, se mezcla muy suavemente con una cuchara y se deja reposar por aproximadamente 30 minutos.

Transcurrido este tiempo, se procede a hacer la prueba del cuchillo. Esta ayuda a determinar el punto de corte óptimo y se realiza cortando una línea en la cuajada, luego el cuchillo se introduce debajo de esa línea y se levanta levemente. El corte debe verse brilloso, limpio, liso y consistente. Si aún no está en ese punto se debe dejar reposar más tiempo.

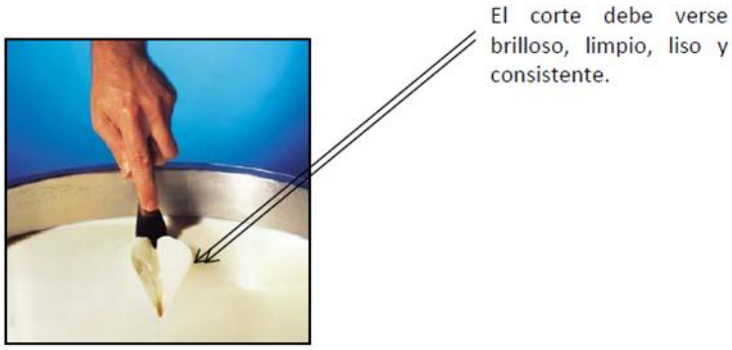


Figura 23. Prueba del cuchillo para verificar la firmeza de la cuajada antes de proceder a cortarla para separar el suero.

Cuando la prueba del cuchillo sea satisfactoria, es decir, cuando ya se haya comprobado la firmeza de la cuajada, se procede a cortarla con el cuchillo en trozos de aproximadamente 1 pulgada por 1 pulgada y se deja reposar 10 minutos, con el fin de separar el suero.

Con una cuchara de cocina, se toman los cuadros de cuajada y se colocan en un colador con una tela de manta para escurrir suavemente el suero.

Una vez escurrido, se adiciona sal al gusto y se proceder a moldear y prensar el queso.

El molde se deja en refrigeración por el periodo que le indique su profesor(a), antes de desmoldar y degustar el queso.

Cuestionario

1. ¿Cuáles son las fuentes de enzimas coagulantes útiles para la fabricación de queso?

2. Describa los cambios microbiológicos que ocurren durante la maduración del queso y el papel de los cultivos lácticos en la fabricación.

3. Investigue el papel de las comunidades microbianas en el rendimiento de los procesos biotecnológicos de interés industrial.

Referencias

Farnworth, E. 2008. Handbook of fermented functional foods. 2nd edition. CRC Press, Taylor & Francis Group. Florida, USA.

Grupo ASEAL (Asesoría en Alimentos), Asunción de Belén, Heredia, Tel. 2589-4141, Sitio web: http://www.grupoaseal.com/

Kindstedt, PS. 2013. The basics of cheesemaking. Microbiology Spectrum, 1(1):CM-0002-2012. doi.10.1128/microbiolspec.CM-0002-2012.

Kun, L.Y. 2006. Microbial Biotechnology. Principles and Applications. 2nd Edition. World Scientific Publishing Co. Pte. Ldt. Toh Tuck Link, Singapore.

Rodríguez, C., Gamboa, MM., Hernández, F., García, JD. 2008. Bacteriología general: principios y prácticas de laboratorio. 2da edición. Editorial de la Universidad de Costa Rica. San José, CR.

Sieuwerts, S., de Bok, FAM., Hugenholtz, J. 2008. Unraveling microbial interactions in food fermentations: from classical to genomic approaches. Applied and Environmental Microbiology, 74 (16): 4997-5007.

ANEXO 1. CONSTITUCION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO USADOS DURANTE EL CURSO

Medio	Composición y pH	Preparación	Uso
Agar Bilis rojo violeta	3 g/l Extracto de levadura 7 g/l Peptona de gelatina 1.5 g/l Sales biliares 10 g/l Lactosa 5 g/l Cloruro de sodio 15 g/l Agar 0.03 g/l Rojo neutro 0.002 g/l Cristal violeta pH 7.1 ± 0.2	Se esteriliza a 121 °C por 15 minutos.	Selectivo y diferencial para reconocer bacterias fermentadoras de lactosa (coliformes).
Agar Papa Dextrosa	200 g/l Infusión de papa 20 g/l Dextrosa 15 g/l agar pH 5.6 ± 0.2	Se esteriliza a 121 °C por 15 minutos. Antes de chorrear se acidifica con ácido tartárico o bien con ácido láctico. Se usan 2 mL de ácido al 10% por cada 100 mL de medio.	Para aislamiento y recuento de hongos y levaduras
Agar de Recuento Estándar	5 g/l Triptona 2.5 g/l Extrato de levadura 1 g/l Glucosa 15 g/l Agar pH 7.0 ± 0.2	Se esteriliza a 121 °C por 15 minutos.	Para recuento de microorganismos aeróbicos, mesofílicos y heterótrofo
Agar Mc Conkey	17 g/l Peptona 4 g/l Polipeptona 10 g/l Lactosa 1.5 g/l Sales Biliares 5 g/l NaCl 13.5 g/l agar 0.03 g/l Rojo neutro 0.001 g/l Cristal violeta pH 7.1 ± 0.2	Se esteriliza a 121°C por 15 minutos	Selectivo para bacilos Gram negativos y diferencial para bacterias fermentadoras de lactosa (coliformes).
Medio Ashby-Sacarosa	5 g/l Sacarosa 1 g/l KH2PO4 0.2 g/l MgSO4.7H2O 0.005 g/l FeSO4.7H2O	Se esteriliza a 121 °C por 15 minutos.	Medio selectivo para bacterias fijadoras de

	0.2 g/l NaCl 0.2 g/l CaCl2.2H2O (15 g/l Agar, si desea solidificar el medio) pH 7.0 ± 0.2		Nitrógeno (*Azotobacter* sp.)
Agar Baird Parker	10 g/l Triptona 5 g/l Extracto de carne 1 g/l Extracto de levadura 10 g/l Piruvato de sodio 12 g/l Glicina 5 g/l Cloruro de litio 20 g/l Agar pH 6.8 ± 0.2	Se autoclava a 121 °C por 15 minutos en porciones de 95 mL. Se enriquece antes de su uso con 5 mL de yema de huevo con telurito de potasio al 1% para los 95 mL del medio enfriado a 50 °C.	Selectivo para el género *Staphylococcus*, diferencial para *S. aureus.*
Agar Müller Hinton	300 g/l Infusión de carne de res 17.5 g/l Casaminoácidos 1.5 g/l Almidón 17 g/l Agar pH 7.2 ± 0.2	Se esteriliza a 121°C por 15 minutos	Pruebas de sensibilidad a antibióticos